

Université de Montréal

Étude du polymorphisme des gènes TAP : TAP1 et TAP2,  
en relation avec la susceptibilité au VIH  
chez les Africains

par  
Julie Lajoie

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc)  
en immunologie

Avril 2003

©Julie Lajoie, 2003



vj

4/

U58

2023

V.118

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude du polymorphisme des gènes TAP : TAP1 et TAP2,  
en relation avec la susceptibilité au VIH  
chez les Africains

Présenté par :  
Julie Lajoie

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

D<sup>r</sup> Jacques Thibodeau  
D<sup>r</sup> Michel Roger  
D<sup>r</sup> Hugo Soudeyns

Mémoire accepté le :

## Sommaire

Le transporteur associé au traitement des antigènes (TAP) présente des peptides antigéniques aux molécules du CMH de classe I. TAP est formé de deux sous-unités : TAP1 et TAP2. Des variations génétiques dans TAP peuvent affecter sa fonction et entraîner une prédisposition à développer des maladies auto-immunes, des cancers et des maladies infectieuses tel le SIDA.

Le but de notre étude est de définir le polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 dans la population Zimbabwéenne. Nous avons exploré la séquence d'ADN composée de 11 exons pour TAP1 et TAP2, chez 45 individus non apparentés, par SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) et séquençage direct. Nous avons typé des mutations qui peuvent affecter la fonction de TAP et qui sont localisées dans le domaine de liaison peptidique ou de liaison à l'ATP. Le typage s'est effectué par ARMS (Amplified Refractory Mutation System) ou par A-RFLP (Amplified-restriction Fragment Length polymorphism) dans deux groupes : 100 africains VIH- et 100 africains VIH+.

Nous avons confirmé 6 mutations déjà décrites pour TAP1 et 11 pour TAP2. De plus, nous avons identifié 5 nouvelles mutations pour TAP1 et 6 pour TAP2. Pour TAP1, ces mutations se situent dans les exons 1, 6, et 7; et pour TAP2, aux exons 1, 3, 4 et 10. Aucune différence de distribution n'a été observée entre les deux groupes.

Notre étude exhaustive du polymorphisme de TAP dans la population africaine a permis d'identifier de nouveaux variants génétiques qui pourraient avoir un impact sur la fonction de la protéine.

**Mots Clés :** TAP, CMH de classe I, Susceptibilité au VIH, Polymorphismes, Population africaine, Transport peptidique, SSCP, ARMS, A-RFLP

## Resume

The transporter associated with antigen processing (TAP) translocates peptides from cytosol into the ER. In the ER, peptides are loaded onto the MHC class I molecules. The TAP complex has two subunits: TAP1 and TAP2. Variations in the TAP sequence could affect its function and increase the susceptibility to develop immune disease, cancer or infectious disease like AIDS.

The aim of this study is to determine the polymorphisms of the TAP1 and TAP2 gene in an indigenous Zimbabwean population (Shona). We analysed the entire coding region of the human TAP1 and TAP2 genes (11 exons each). The first screening was made by SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) on 45 unrelated individuals followed by sequencing. We typed some non-synonymous mutations, which were located in the peptide binding domain or in the ATP binding domain. The typing was performed by ARMS (Amplification Refractory Mutation System) or by A-RFLP (Amplified- Restriction Fragment Length Polymorphism) methods in a population of 100 individuals HIV+ and 100 individuals HIV-.

We confirmed 6 already known mutations for TAP1 and 11 for TAP2. Furthermore, we have identified 5 new mutations for TAP1 and 6 for TAP2. For TAP1 those polymorphisms are located in the exons 1, 6 and 7 and for TAP2, in the exons 1, 3, 4, and 10. The typing of the two groups studied did not show any differences.

Finally, this study of a Zimbabwean population permitted us to confirm and find some new genetics variants that could affect the TAP function.

**Key Words :** TAP, Polymorphism, MHC class I, HIV susceptibility, African population, SSCP, ARMS, A-RFLP

## Table des matières

Sommaire.....	iii
Resume .....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux : .....	viii
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations : .....	xi
Liste des acides aminés: .....	xiii
Introduction :.....	1
Revue de littérature : .....	3
1. Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I .....	3
1.1. Assemblage du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.....	3
1.2. La présentation des peptides aux lymphocytes T cytotoxiques .....	5
1.2.1 Les protéines antigéniques présentées aux lymphocytes T cytotoxiques.....	5
1.2.2 La dégradation des protéines en peptides.....	6
1.2.3 Le transport peptidique du cytosol au RE .....	8
2. Les transporteurs ABC .....	9
2.1. Les caractéristiques des transporteurs ABC.....	9
2.2. Des exemples de transporteurs ABC chez l'humain.....	10
3. Les transporteurs des antigènes apprêtés : TAP1 et TAP2 .....	11
3.1. Historique de la découverte des gènes TAP1 et TAP2 .....	11
3.2. Les protéines TAP .....	13
3.2.1. L'hétérodimère TAP.....	13
3.2.2. Les domaines de l'hétérodimère.....	14
3.3. TAP effectue un transport actif .....	18
3.4. L'affinité peptidique.....	22
3.4.1. La sélection des acides aminés.....	22
3.4.2. Facteur génétique affectant l'efficacité de la présentation des peptides par TAP au CMH de classe I.....	25

4. Les gènes TAP1 et TAP2 .....	25
4.1. La structure génomique des gènes TAP .....	25
4.2. La régulation des gènes TAP.....	26
4.3. Les régions exprimées par chaque exons .....	29
4.4. Polymorphismes dans les gènes TAP.....	29
5. Association entre TAP et maladies .....	35
5.1. Les maladies génétiques.....	36
5.2. Maladies auto-immunes et les rejets de greffes.....	37
5.3. L'association avec les cancers.....	40
5.4. L'association avec des maladies infectieuses.....	41
6. Le VIH et TAP .....	43
6.1. Épidémiologie .....	43
6.2. Les facteurs génétiques .....	43
Hypothèse et objectifs .....	47
Articles .....	50
Résultats suite:.....	103
Partie III : .....	103
Fréquence des mutations dans les groupes VIH+ et VIH- pour TAP1 .....	104
Partie IV : .....	108
Résultats des fréquences obtenues pour les populations VIH+ et VIH- dans le gène TAP2 .....	108
Discussion : .....	112
Les études génétiques en relation avec les maladies à traits complexes .....	112
Étude du polymorphisme du gène TAP 1 .....	114
Polymorphismes du gène TAP2.....	119
Le polymorphisme des gènes TAP et la susceptibilité au VIH.....	124
Conclusion :.....	126



Références : .....	128
Remerciements .....	i
Dédicace .....	ii
Annexe.....	iii

## Liste des tableaux :

### Revue de littérature :

**Tableau 1** : Polymorphismes déjà connus dans les régions codantes de TAP1 .....30

**Tableau 2** : Mutations répertoriées pour les régions codantes du gène TAP2 .....31

**Tableau 3** : Les différents allèles de TAP1 basés sur les substitutions d'a.a. ....33

**Tableau 4** : Affectation des allèles de TAP2 selon les substitutions d'acide aminé. .35

**Tableau 5** : Relation entre des allèles HLA et des polymorphismes de TAP sur le..46  
taux de progression du VIH vers le SIDA.....46

### ARTICLE 1

**Table 1** : Primer sequences and annealing temperatures for amplifying TAP1 exons  
for SSCP and DNA sequencing analyses .....74

**Table 2** : Primer sequences, annealing temperatures and restriction-endonuclease  
enzymes for A-RFLP typing of TAP1 .....75

**Table 3** : TAP1 nucleotide sequence variations observed in Zimbabweans .....76

**Table 4** : Allelic frequencies of TAP1 single nucleotide polymorphisms observed in  
193 Zimbabweans.....77

**Table 5** : TAP1 allele frequencies (%) in different populations .....78

### ARTICLE 2

**Table 1** : Oligonucleotide primers used to amplify the coding region of TAP2 for  
SSCP and sequencing.....99

<b>Table 2</b> : Primer sequences, annealing temperatures and restriction-endonuclease enzymes for A-RFLP typing of TAP2 .....	100
--	-----

<b>Table 3</b> : TAP2 nucleotide sequence variations observed in Zimbabweans .....	101
--	-----

<b>Table 4</b> : Allelic frequencies of TAP 2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in different populations .....	102
---	-----

## RÉSULTATS SUITE

Tableau I : Distribution allélique de cinq mutations fonctionnelles de TAP1 .....	106
---	-----

Tableau II : Fréquence des allèles reconnus par l'organisation mondiale de la santé et basée sur les substitutions d'acides aminés pour TAP1, dans un groupe VIH+(93 individus) et un groupe VIH- (100 individus).....	107
--	-----

Tableau III : Distribution allélique de sept mutations individuelles situées dans les régions codantes du gène TAP2 pour un groupe de 90 individus non apparentés VIH+ et un groupe de 102 individus non apparentés VIH-. .....	110
---	-----

Tableau IV : Fréquence des allèles reconnus par l'organisation mondiale de la santé, pour le gène TAP2 dans une population Zimbabweenne composée de deux groupes : un constitué de 90 individus VIH+ et l'autre de 102 individus VIH- .....	111
---	-----

## Liste des figures

### Revue de littérature :

Figure 1 : Le cheminement des peptides antigéniques du cytosol à la surface cellulaire ..... 7

Figure 2 : Représentation des trois domaines de chacune des sous-unité du transporteur TAP ..... 16

Figure 3 : Le cycle du transport des peptides par le transporteur TAP illustrant l'action de l'ATP sur les deux sous-unités du complexe ..... 21

Figure 4 : Représentation de la localisation des gènes TAP1 et TAP2 dans la région des gènes du CMH de classe II, situé dans le chromosome 6 ..... 27

## Liste des abréviations :

ABC : Transporteur à cassette liant l'ATP

a.a. : acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique copie

ADP : Adénosine di-phosphate

A-RFLP : Amplified- Restriction fragment length polymorphism

ARMS : Amplification Refractory Mutation System

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine Triphosphate

BLS : Syndrome lymphocyte de Bare

CFTR : Régulateur transmembranaire de la mucoviscidose

*cim* : Class I modifiers

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CTL : Lymphocyte T cytotoxique

CTP : Cystéine triphosphate

GTP : Guanosine triphosphate

HAM: Antigène d'histocompatibilité modifié ou Histocompatibility antigen modifier

HCMV : Cytomégalovirus humain

HCV : Virus de l'hépatite C

HLA : Antigène leucocyte humain ou Human leukocyte antigen

HPV : Papillomavirus humain

HSV : Virus Herpès simplex

IL : Interleukine

IFN : Interféron

ISRE : Élément de réponse stimulée

kDa : kilo Dalton

LMP : Low-molecular weight protein

MDR : Multi-drug resistance

mtp: Protéine transporteur liée au CMH ou MHC linked transporter protein

NBD: Domaine de liaison nucléotidique

OMS : Organisation mondiale de la santé

ONU : Organisation des Nations Unies

PSF : Peptide supply factor

RE : Réticulum Endoplasmique

RING : Nouveau gène réellement intéressant ou really interesting new gene

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SP : Séquence d'ADN reconnue

TAP : Transporteur associé au traitement des antigènes ou transporter antigen  
processing

TM : Transmembranaire

TMD : Domaine transmembranaire

TNF : Facteur nécrosant les tumeurs

UTP : Uracile triphosphate

VIH : Virus d'immunodéficience humaine

$\beta_2$ -m :  $\beta_2$ -microglobuline

**Liste des acides aminés:**

Ala (A): Alanine

Arg (R) : Arginine

Asn (N): Asparagine

Asp (D): Acide aspartique

Cys(C) : Cystéine

Gln (Q): Glutamine

Glu (E): Acide glutamique

Gly (G): Glycine

His (H): Histidine

Ile (I): Isoleucine

Leu (L): Leucine

Lys (K): Lysine

Met (M): Méthionine

Phe (F) Phénylalanine

Pro (P): Proline

Ser (S): Sérine

Thr (T): Thréonine

Trp (W): Tryptophane

Tyr (Y): Tyrosine

Val: (V): Valine

## Introduction :

Le complexe des transporteurs associés au traitement des antigènes (TAP) permet la présentation des peptides antigéniques au complexe d'histocompatibilité de classe I (CMH I). Cette étape est cruciale pour la présentation des antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les variations génétiques dans la séquence des gènes TAP1 et TAP2 peuvent avoir des incidences sur la fonction du transporteur. Plusieurs études tendent à démontrer qu'il pourrait y avoir une association entre des mutations dans les régions codantes de TAP et certaines maladies, comme des maladies auto-immunes, certains cancers et des maladies infectieuses tel le SIDA (Revue par: Lankat-Buttgereit et Tampe, 1999; Lankat-Buttgereit et Tampe, 2002; Roger, 1998).

Jusqu'à ce jour, les études liées aux polymorphismes de TAP ont surtout été effectuées à partir de populations caucasiennes et ce, même si la distribution des pathogènes est très différente en Afrique, ce qui pourrait ainsi favoriser la présence de mutations absentes dans d'autres populations. L'objectif de ce travail est de déterminer le polymorphisme des régions codantes de la séquence d'ADN des gènes TAP1 et TAP2 dans une population africaine provenant du Zimbabwe (ethnie Shona) et d'établir la fréquence de certaines de ces mutations dans des groupes d'individus africains VIH+ et VIH-.

Avant d'aborder le travail de recherche lui-même, nous réviserons d'abord les étapes de l'assemblage du CMH de classe I, le mécanisme de fonctionnement du complexe TAP, la structure protéinique et génomique de ce transporteur, ainsi que des associations entre TAP et certaines maladies. Par la suite, nous aborderons le sujet du VIH et de la susceptibilité à développer le SIDA selon la présence de certains facteurs génétiques comme TAP. Ceci nous conduira aux hypothèses et objectifs de cette étude. Vous retrouverez ensuite deux articles dans lesquels sont illustrés les résultats de l'analyse de la séquence d'ADN des gènes TAP1 et TAP2, les fréquences obtenues pour certaines de ces mutations dans la population africaine totale analysée,



ainsi que les méthodes utilisées. Dans la troisième et la quatrième partie des résultats, vous trouverez les fréquences des mutations typées dans les deux groupes d'individus (VIH<sup>+</sup> et VIH<sup>-</sup>) pour TAP1 et TAP2. Finalement, il y aura la discussion, suivie de la conclusion.

## Revue de littérature :

### 1. Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I sont exprimées sur toutes les cellules nucléées et ce vraisemblablement parce que les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) doivent être capables de cibler n'importe quelle cellule de l'organisme qui se trouve infectée par un microbe intracellulaire.

#### 1.1. Assemblage du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

Le CMH de classe I (CMH I) est un hétérodimère dont les domaines extracellulaires amino terminaux se lient aux antigènes pour leur présentation aux cellules T. Les gènes du CMH de classe I humain sont situés sur le chromosome 6. Chaque gène de classe I code pour une chaîne polypeptidique transmembranaire particulière, appelée alpha ( $\alpha$ ) ou chaîne lourde, qui comprend trois domaines extracellulaires (Revue par: Elliott, 1997). Chaque chaîne  $\alpha$  est liée de façon non covalente à une protéine extracellulaire non glycosylée, la  $\beta_2$ -microglobuline ( $\beta_2$ -m). Celle-ci interagit avec la portion extracellulaire de la chaîne lourde et n'est pas attachée de façon directe à la cellule. La  $\beta_2$ -microglobuline n'est pas codée par les gènes du CMH mais par un gène situé sur le chromosome 15.

L'assemblage des deux chaînes se fait entre autre grâce à l'action d'au moins quatre protéines soient la calnexine, la calréticuline, la Erp57 et la tapasine. Ces dernières ont pour rôle le chargement et la rétention du CMH dans le réticulum endoplasmique (RE) (van Endert, 1999). L'assemblage du CMH de classe I se fait en plusieurs étapes. Au tout début, la chaîne lourde du CMH s'associe avec la calnexine, une lectine transmembranaire calcium-dépendante (Pamer et Cresswell, 1998). La calnexine a un rôle de chaperone, elle se lie uniquement avec la chaîne lourde du CMH de classe I, et non pas avec le complexe chaîne lourde-  $\beta_2$ -microglobuline (Solheim, 1999; Nossner et Parham, 1995). Cette protéine aide au chargement et à la

formation d'un pont disulfure entre la chaîne lourde et la chaîne légère de la  $\beta_2$ -microglobuline (van Endert, 1999; Vassilakos *et coll.*, 1996), en protégeant et en stabilisant la chaîne lourde de classe I (Solheim, 1999; Williams et Watts, 1995). Après que la calnexine se soit liée à la chaîne lourde du CMH, il y a liaison de la chaîne légère de la  $\beta_2$ -microglobuline à la chaîne  $\alpha$ . La calnexine sera ensuite remplacée par la calréticuline, une autre lectine dépendante de calcium, et le ERp57, un thiol réductase (Sadasivan *et coll.*, 1996). La calréticuline aide à retenir les molécules de classe I dans le RE (van Endert, 1999; Lewis et Elliott, 1998), alors que la ERp57 est une enzyme qui catalyse l'isomérisation des ponts disulfures entre les protéines (Cresswell *et coll.*, 1999). L'hétérodimère de classe I, associé avec la calréticuline et le ERp57 oxidoréductase, va ensuite se lier avec la tapasine, puis avec le transporteur associé au traitement des antigènes (TAP) ce qui forme le complexe de chargement macromoléculaire (Sadasivan *et coll.*, 1996). L'interaction entre TAP et le CMH de classe I est optimale lorsqu'il y a présence de la  $\beta_2$ -microglobuline et absence de peptide lié au CMH (Hammerling *et coll.*, 1999). La tapasine est une protéine transmembranaire de 48 kilos Dalton (kDa) qui possède un signal de rétention pour le RE (Ortmann *et coll.*, 1997). Elle est nécessaire pour un assemblage efficace entre le peptide et le CHM de classe I (van Endert, 1999; Herberg *et coll.*, 1998), puisqu'elle stabilise le dimère  $\beta_2$ -microglobuline-chaîne lourde de classe I en absence de peptides dans le domaine de liaison peptidique du CMH (Cresswell *et coll.*, 1999; Gretea *et coll.*, 1997). La tapasine augmente également l'expression du complexe TAP (van Endert, 1999; Lehner *et coll.*, 1998). En absence de la tapasine, il ne peut y avoir d'interaction entre les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et TAP, ce qui a pour conséquence de retenir les molécules du CMH de classe I dans le RE et donc, d'appauvrir la réponse immunitaire (Revue par : Elliott, 1997; Furukawa *et coll.*, 1999a; Greenwood *et coll.*, 1994).

Le complexe de chargement macromoléculaire formé, le peptide lié à TAP va être chargé dans le domaine de liaison peptidique du CMH de classe I. Cette liaison va

permettre au CMH de classe I de se libérer du complexe de chargement macromoléculaire et de quitter le RE vers la surface cellulaire via l'appareil de Golgi. Une fois à la surface cellulaire, le CMH de classe I va présenter le peptide aux lymphocytes T cytotoxiques ( $CD8^+$ ) qui vont enclencher une réponse immunitaire (Hilton *et coll.*, 2001; Spiliotis *et coll.*, 2000).

## **1.2. La présentation des peptides aux lymphocytes T cytotoxiques**

Chaque individu possède un nombre restreint de types de molécules du CMH qui, ensemble, doivent être capables de présenter aux cellules T des fragments peptidiques issus de presque toutes les protéines étrangères. Pour que les peptides soient présentés par le CMH aux CTL, plusieurs étapes doivent se dérouler. Les principales étapes sont les suivantes : (Figure 1)

1. Synthèse de protéines antigéniques dans le cytosol ou transport de protéines antigéniques dans le cytosol
2. Dégradation protéolytique des protéines cytosoliques en peptides
3. Transport des peptides dans le RE par TAP
4. Assemblage des peptides au complexe du CMH de classe I dans le RE
5. Expression du complexe peptide-CMH de classe I à la surface cellulaire

### **1.2.1. Les protéines antigéniques présentées aux lymphocytes T cytotoxiques**

Pour qu'un peptide soit présenté aux CTL, il doit d'abord passer par le cytosol des cellules. Les peptides qui seront présentés aux CTL par le CMH de classe I sont principalement des peptides qui dérivent de protéines antigéniques de virus ou de certaines bactéries qui ont une répllication cytosolique ou qui passent par le cytosol, comme les mycobactéries. Ces dernières se trouvent dans les vésicules phagocytiques, mais il arrive que ces vésicules se brisent et que les mycobactéries se retrouvent dans le cytosol. Il y aura donc présentation de ces antigènes aux lymphocytes T cytotoxiques (Revue par: Lankat-Buttgereit et Tampe, 2002).

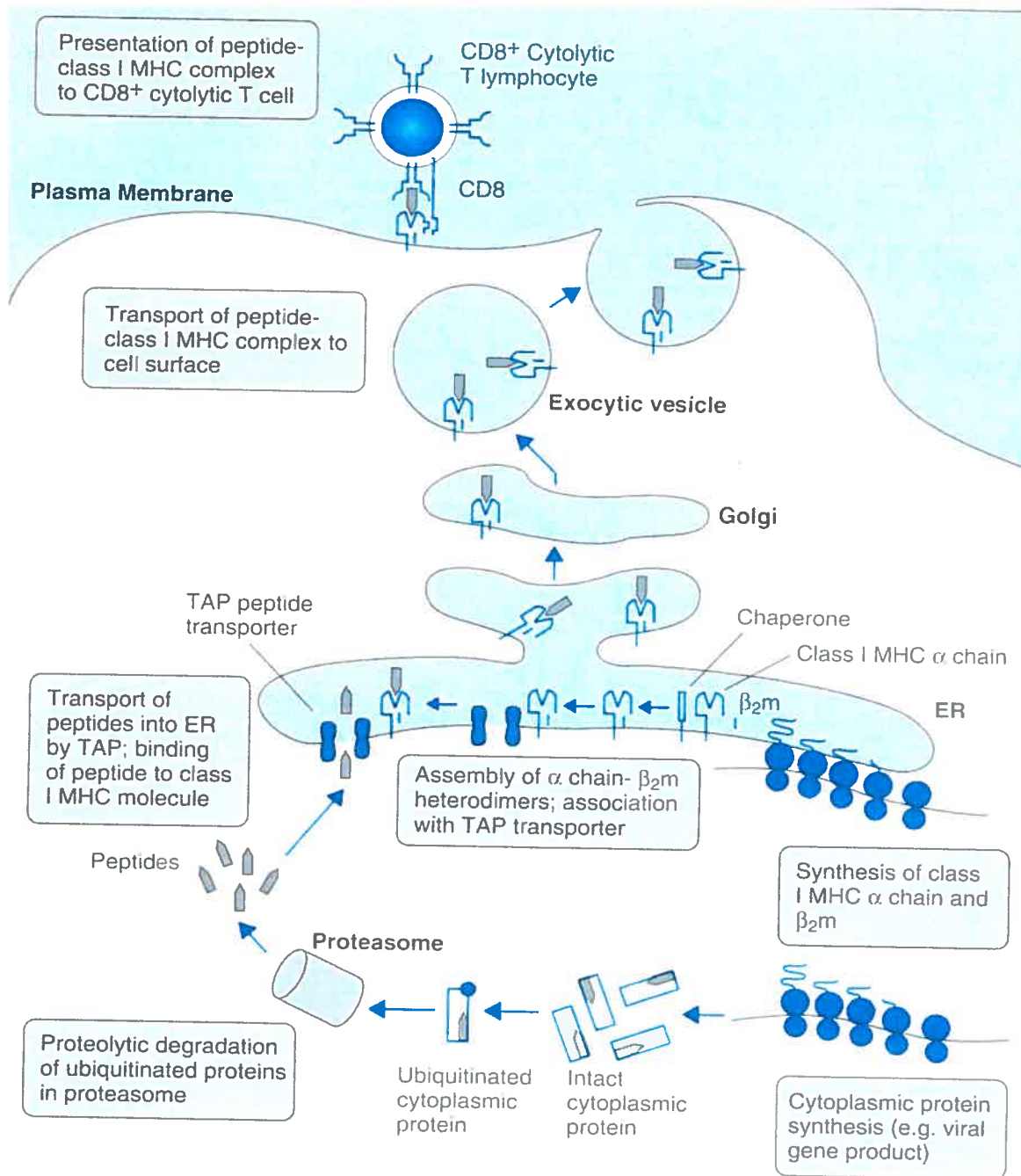
Pour les virus, des protéines ou des transcrits d'acide ribonucléique (ARN), se retrouvant dans le cytosol seront présentés aux CTL qui les désigneront comme étant du non-soi et déclencheront ainsi une réponse immunitaire cela bien sûr, à la condition que le virus n'inhibe pas une étape vers la présentation aux CTL.

Les cellules T CD8 activées ( $CD8^{+}$ ) sont également importantes pour reconnaître et détruire les cellules cancéreuses qui expriment des gènes mutés ou des gènes qui ne sont pas exprimés dans les cellules d'adultes normales.

### **1.2.2 La dégradation des protéines en peptides**

La dégradation des protéines antigéniques en peptides s'effectue dans le cytosol par le protéasome. Ce dernier est un grand complexe protéasique multicatalytique composé de 28 sous-unités dont chacune a entre 20 et 30 kDa. Ce complexe de protéases est situé dans le cytosol ou dans le noyau et sert pour la dégradation de la plupart des protéines cellulaires, mais également pour la dégradation des protéines antigéniques en peptides (Niedermann *et coll.*, 1999). Les protéines, qui sont ciblées pour la dégradation protéasomale sont marquées par plusieurs copies d'une petite protéine, nommée l'ubiquitine. L'ubiquitination (processus de marquage) requiert l'adénosine triphosphate (ATP) et une variété d'enzymes disponible dans le protéasome.

**Figure 1 :** Le cheminement des peptides antigéniques du cytosol à la surface cellulaire



Tiré de : Abbas et coll., 1997

Deux des sous-unités catalytiques du protéasome, appelées low-molecular-weight protein (LMP)2 et LMP 7 sont codées dans la région des gènes du CMH de classe II sur le chromosome 6 et leur expression est induite par certains composés chimiques sécrétés par les cellules, les interférons (van Endert, 1999). Une troisième sous-unité, qui est codée à l'extérieur des gènes du CHM, est aussi induite par les interférons. Ces trois sous-unités déplacent, lorsqu'elles sont exprimées, des sous-unités constitutives du protéasome. Seules ces trois sous-unités inductibles et leurs contreparties constitutives sont des protéases actives. Lors d'un traitement aux interférons, la spécificité du protéasome est modifiée pour accroître le clivage des polypeptides ubiquitinées derrière les résidus hydrophobes et basiques, et pour inhiber le clivage après les résidus acides. Ainsi, sont produits des peptides ayant des résidus carboxy-terminaux, qui représentent les résidus préférés de la plupart des molécules du CMH de classe I. Ceux-ci représentent également les structures préférées pour le transport par TAP (van Endert, 1999).

### **1.2.3 Le transport peptidique du cytosol au RE**

Comme il a été mentionné précédemment, les molécules du CMH de classe I sont assemblées dans le RE et ce processus se termine par la liaison avec un peptide qui a été généré dans le cytosol. Il doit donc exister un mécanisme qui permet le passage des peptides du cytosol au réticulum endoplasmique. Ce phénomène se fait grâce à une protéine qui agit comme un transporteur. Les gènes codant pour ce transporteur sont homologues à une famille de gènes qui codent pour des protéines effectuant le transport de composés de faibles poids moléculaires à travers les membranes intracellulaires de façon ATP-dépendante. Les deux gènes, qui codent pour ces protéines, sont les gènes TAP 1 et TAP 2. Ceux-ci codent chacun pour une protéine, qui forment un hétérodimère situé dans la membrane du RE. C'est cet hétérodimère qui assure le transport actif des peptides du cytosol au RE.



Ainsi, TAP lie les peptides antigéniques dans le cytosol et fait passer ceux-ci dans le RE où il les charge sur les molécules du CMH I nouvellement synthétisées grâce à l'action de la tapasine (voir section 1.1).

Le peptide chargé sur le CMH mature sera ensuite présenté aux lymphocytes T cytotoxiques qui déclencheront la lyse de la cellule.

## **2. Les transporteurs ABC**

Comme il vient d'être mentionné, c'est grâce au transporteur TAP que les peptides passent du cytosol au RE. Celui-ci est un transporteur faisant parti de la famille des transporteurs à cassette liant l'ATP (ABC).

### **2.1 Les caractéristiques des transporteurs ABC**

Les membres de cette famille sont des protéines qui transportent une grande variété de molécules comme des ions, des sucres, des polysaccharides, des acides aminés et des oligo- ou polypeptides à travers les membranes cellulaires. On retrouve les protéines ABC chez plusieurs espèces tant procaryotes qu'eucaryotes (Revue par : Higgins et Linton, 2001; Ritz et Seliger, 2001; Higgins, 1992).

Les transporteurs ABC sont, entre autre, caractérisés par la présence d'au moins un domaine de liaison nucléotidique (NBD) d'environ 200 acides aminés (a.a), qui contient deux séquences hautement conservées pour la liaison à l'ATP soit le motif Walker A et Walker B (Sadée *et coll.*, 1995). Le second trait structural qui caractérise ces protéines est la présence d'un composant intégré à la membrane qui est appelé le domaine transmembranaire (TMD) (Revue par : Elliot, 1997). En général, pour que le transporteur soit fonctionnel il doit posséder quatre domaines; soient, deux domaines hydrophobes contenant 6 à 8 segments transmembranaire chacun, qui vont former le pore, et deux domaines de liaison à l'ATP. Pour être fonctionnel, les transporteurs ABC doivent utiliser de l'énergie sous la forme nucléoside triphosphate.

Chacun de ces quatre domaines peut être exprimé sur des gènes différents comme c'est le cas pour la perméase oligopeptidique de *Salmonella typhimurium*, ou bien, deux domaines sont combinés sur le même gène, mais il faut alors une expression simultanée de deux gènes pour avoir un transporteur fonctionnel (ex. TAP1-2). La dernière possibilité est que les quatre domaines soient exprimés sur un seul gène (ex. le régulateur transmembranaire de la mucoviscidose: CFTR) (Sadée *et coll.*, 1995). Le transport actif effectué par ces protéines se fait de façon ATP-dépendante (Doige et Ames, 1993; Higgins, 1992). Les transporteurs ABC sont donc, des enzymes conventionnelles qui vont changer de conformation en réponse à la liaison et à l'hydrolyse de l'ATP. Ce changement structural entraîne un changement dans l'affinité et l'orientation des sites de liaisons aux substrats au niveau du domaine transmembranaire (TMD) (Higgins et Linton, 2001; Hung *et coll.*, 1998).

## 2.2 Des exemples de transporteurs ABC chez l'humain

On retrouve chez l'humain plusieurs transporteurs ABC et ceux-ci jouent un rôle important dans différentes pathologies humaines. C'est le cas du régulateur transmembranaire de la mucoviscidose. Celui-ci agit comme un canal ionique pour le chlore et est impliqué dans la fibrose kystique. Il y a également le transporteur ABCA1 qui cause une déficience en lipoprotéine (maladie de Tangier) (Revue par: Lankat-Buttgereit et Tampe, 2002; Klein *et coll.*, 1999).

Un autre type de transporteur ABC que l'on retrouve chez l'homme, est la P-glycoprotéine qui est codé par les gènes de résistance pléiotropique aux drogues (multi-drug resistance: MDR). Ce transporteur est, entre autre, impliqué dans la résistance aux médicaments pour le traitement de certains cancers. Il est une des principales cause d'échec thérapeutique aux traitements anti-cancer (Sadée *et coll.*, 1995; Sorrentino *et coll.*, 1992) et empêche l'action des inhibiteurs de protéase dans le traitement contre le virus d'immunodéficience humaine (VIH).

Un autre type de transporteur présent chez l'humain est le transporteur TAP qui est impliqué dans les premières étapes de la réponse immunitaire cellulaire cytotoxique et, plus précisément, dans la présentation peptidique au CMH de classe I.

### 3. Les transporteurs des antigènes apprêtés : TAP1 et TAP2

#### 3.1. Historique de la découverte des gènes TAP1 et TAP2

La découverte des gènes responsables de la présentation des antigènes au CMH de classe I s'est fait en étudiant des lignées cellulaires qui démontraient le phénomène *cim* (class I modifiers); c'est-à-dire que pour ces cellules, l'expression des molécules du CMH de classe I à la surface cellulaire était fortement réduite. Ces lignées cellulaires, soient RMA-S et LBL721.174, en plus de montrer une faible expression du CMH de classe I, étaient déficientes en ce qui concerne la présentation des antigènes et ce, même si le niveau d'expression de la chaîne lourde du CMH et de la  $\beta_2$ -microglobuline était normal. De plus, si on additionnait ou introduisait des peptides exogènes à l'intérieur du RE, ceux-ci étaient présentés efficacement à la surface cellulaire alors que les peptides endogènes ne l'étaient pas. Il est donc devenu clair que ce défaut était dû à une délétion dans la région des gènes du CMH et que probablement cela impliquait les gènes responsables du transport des peptides du cytosol à la lumière du RE et du chargement des peptides sur les molécules du CMH I nouvellement synthétisées. Par la suite, quatre groupes de recherche ont décrit des gènes qui pouvaient être responsables du transport peptidique (Bahram *et coll.*, 1991; Deverson *et coll.*, 1990; Monaco *et coll.*, 1990; Powis *et coll.*, 1992).

En premier, Deverson *et coll.* qui s'intéressaient aux gènes responsables du phénomène *cim* ont découvert deux gènes chez le rat, qu'ils ont appelés mtp1 et mtp2 (protéines transporteuses liées au CMH) (Deverson *et coll.*, 1990). Cette découverte a été faite en étudiant une librairie d'ADN copie (ADNc) qui couvrait la région des gènes responsables du phénomène *cim* avec des cosmides de souris.

Au même moment, Monaco *et coll.* ont suggéré qu'une partie des gènes dans la région du CMH de classe II, pouvait influencer l'expression du CMH de classe I à la surface cellulaire, en régulant la disponibilité des peptides qui s'y lient et en stabilisant les molécules du CMH de classe I. Deux gènes relativement proches de cette région chez la souris, HAMI et HAM2 (histocompatibility antigen modifier; antigène d'histocompatibilité modifié), ont été clonés et séquencés. Ces gènes ont montré des similarités avec une superfamille de gènes responsables du transport ATP-dépendant. Les deux protéines polymorphiques chez la souris étaient codées dans la région des gènes responsable du phénomène *cim*. (Monaco *et coll.*, 1990; Brown *et coll.*, 1991)

Par la suite, d'autres équipes ont identifié des gènes humains qui pouvaient être responsables du phénomène *cim*. Ainsi, Trowsdale *et coll.* ont identifié les gènes RING4 et RING11 (really interesting new gene, nouveau gène réellement intéressant) en utilisant des clones YAC (chromosomes artificiels de levure) et une librairie d'ADNc qui couvraient la région des gènes délétés dans les cellules LBL721.174. Ils ont également proposé que les protéines résultantes forment un hétérodimère qui transporte les peptides du cytosol au RE. (Trowsdale *et coll.*, 1990; Powis *et coll.*, 1992).

La dernière équipe, Spies *et coll.*, a quant à elle, découvert les gènes humains psf1 et psf2 (peptide supply factor). La séquence complète de ces gènes a été déterminée par des clones ADNc. En fait, des fragments d'ADNc ont été clonés dans le phage M13, et la séquence a été obtenue à partir des deux brins (Spies *et coll.*, 1990; Bahram *et coll.*, 1991).

En séquençant tous ces nouveaux gènes, il a été constaté que les gènes humains RING4 et PSF1 étaient en réalité le même gène que mtp1 chez le rat et HAM1 chez les souris. Il en était de même pour les gènes humains RING11 et PSF 2 qui étaient identiques aux gènes mtp2 et HAM2 des rongeurs.

Pour clarifier la littérature, en 1990, il a été décidé d'utiliser le terme TAP pour identifier la protéine codée par les gènes précédemment mentionnés. En 1991, le Comité de nomenclature de l'organisation mondiale de la santé pour les facteurs du système HLA (WHO nomenclature committee for factors in the HLA system) a officialisé ce nom. Ainsi, les gènes RING4, PSF1, mtp1 et HAM1 ont été renommés TAP1 et les gènes RING11, PSF2, mtp2 et HAM2 ont été nommés TAP2.

### **3.2. Les protéines TAP**

En utilisant différentes approches expérimentales, la localisation de TAP a pu être déterminée. La microscopie électronique ainsi que d'autres techniques, ont démontré la distribution intracellulaire de TAP à l'intérieur du RE et du cis-Golgi (Vos *et coll.*, 1999; Kleijmeer *et coll.*, 1992; Meyer *et coll.*, 1994).

#### **3.2.1. L'hétérodimère TAP**

Les transporteurs ABC se retrouvent sous plusieurs formes. Ainsi, CFTR est un monomère alors que le transporteur Opp chez la *Salmonelle* est un tétramère (Revue par : Elliot, 1997). En ce qui concerne TAP, la coexpression de TAP1 et TAP2 chez les insectes et les levures suggère que celui-ci fonctionne comme un hétérodimère constitué de deux sous-unités : TAP1 et TAP2. Ce modèle est d'ailleurs supporté par le fait que dans les cellules où l'expression de TAP1 ou TAP2 est déficiente, il n'y a pas de transport peptidique, mais que cette fonction peut être restaurée en transférant le gène manquant (Ritz et Seliger, 2001; Ljunggren *et coll.*, 1990; Spies et DeMars, 1991; Powis *et coll.*, 1991; Van Kaer *et coll.*, 1992; Seliger *et coll.*, 2000). Ainsi, les homodimères TAP1 et TAP2 ne sont pas fonctionnels. Pour être fonctionnelles, les sous-unités TAP1 et TAP2 doivent être sous la forme d'un hétérodimère et aucun facteur additionnel du système immunitaire n'est requis pour

la formation du complexe TAP (Moins-Teisserenc *et coll.*, 1995; Furukawa *et coll.*, 1999b).

### 3.2.2. Les domaines de l'hétérodimère

Chez l'homme, la sous-unité TAP1 est constituée de 748 a.a., alors que la sous-unité TAP2 est formée de 703 a.a. (Momburg et Hammerling, 1998). Comme les transporteurs ABC, chacune des sous-unités de TAP possède un domaine transmembranaire de liaison peptidique et un domaine de liaison nucléotidique (voir figure 2). Chaque transporteur TAP possède donc trois grands domaines :

- deux domaines hydrophobes transmembranaires (TMD)
- deux domaines de liaison nucléotidique (NBD)
- le pore

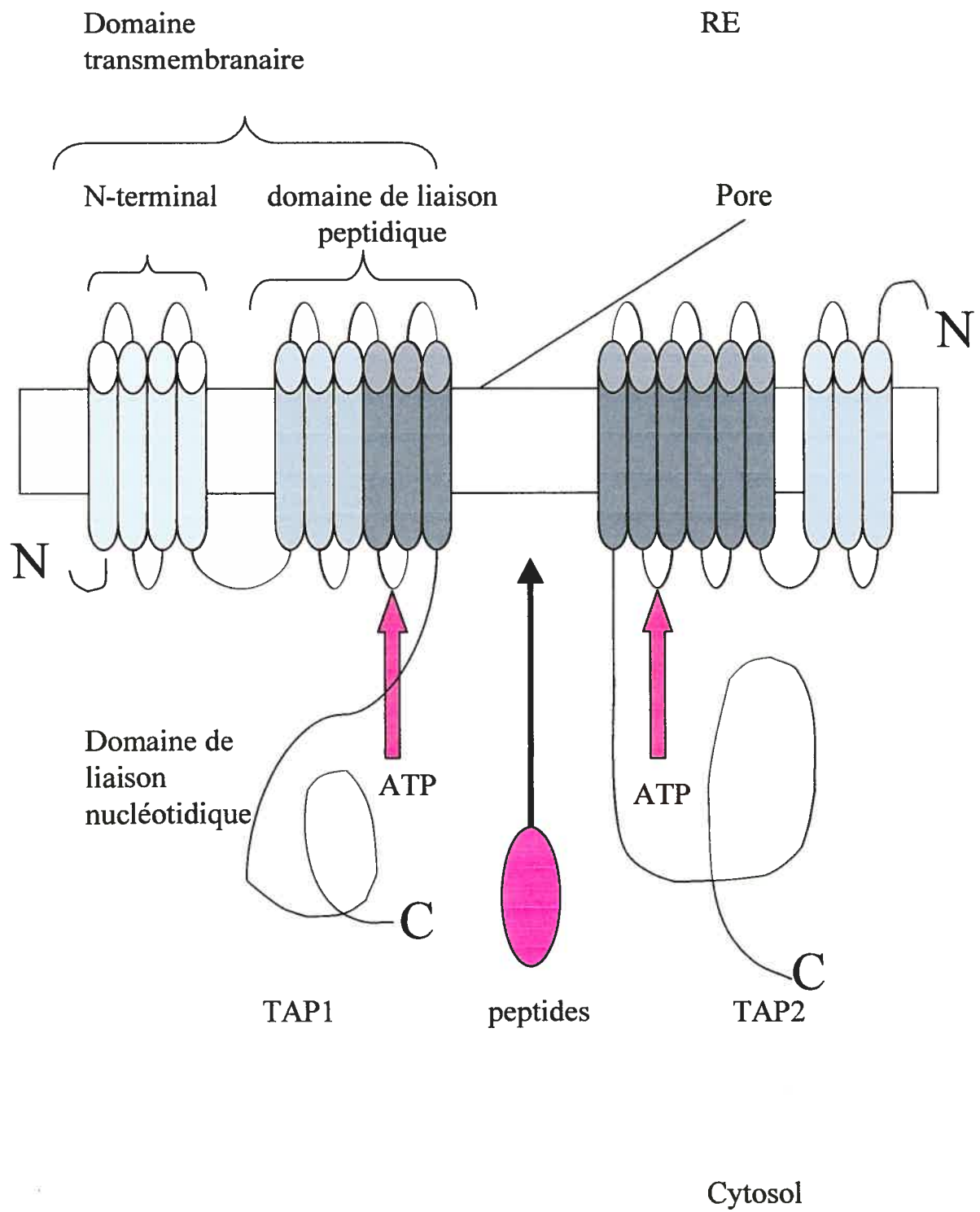
Pour TAP1, les parties N-terminale et C-terminale sont localisées dans le cytoplasme, alors que pour TAP2, seule la partie C-terminale se retrouve dans le cytoplasme. La région N-terminale de TAP1 contient quatre séquences de glycosylation situées en position 227, 250, 279 et 302, alors que la région N-terminal de TAP2 n'en contient aucune. La séquence en position 227 est située à la frontière du RE et la séquence 302 est, quant à elle, située à la frontière du cytosol. Ces deux séquences sont donc presque inaccessibles pour la glycosylation. Les deux autres sites de glycosylation sont localisés dans la partie hydrophile de la protéine. Les domaines transmembranaires de TAP sont composés de 8 segments pour TAP1 et de 7 segments pour TAP2 (Vos *et coll.*, 1999; Ritz et Seliger, 2001; Vos *et coll.*, 2000) et ces deux domaines sont requis pour la liaison peptidique (Arora *et coll.*, 2001; Androlewicz *et coll.*, 1994). Pour démontrer cela, Arora *et coll.* ont créé des chimères. Celles-ci étaient constituées de la façon suivante : TMD de TAP 1 avec NBD de TAP2(T1MT2C), TMD de TAP2 avec NBD TAP1 (T2MT1C), et ainsi ils ont créé les hétérodimères suivant : TAP1/T1MT2C, TAP2/T2MT1C et TAP1/TAP2. Ils ont donc mesuré la capacité de liaison peptidique en détectant la fluorescence émise par un peptide lié à la fluorescéine. Ainsi, aucune fluorescence n'a été détectée

dans les microsomes exprimant TAP1-T1MT2C ou TAP2-T2MT1C, indiquant que ces complexes n'étaient pas fonctionnels. En comparaison, la liaison peptidique pour les complexes TAP1/T2MT1C, TAP2/T1MT2C et T1MT2C/T2MT1C était comparable à celle obtenue avec les types sauvages, ce qui démontre que les domaines transmembranaires des deux sous-unités sont indispensables pour former un site de liaison peptidique de haute affinité. Ces résultats ont aussi permis de voir que les domaines de liaison nucléotidique des deux sous-unités ne contiennent pas de déterminant requis pour la liaison peptidique (Arora *et coll.*, 2001).

Les deux domaines transmembranaires et les deux domaines de liaison nucléotidique forment ensemble le pore. Ce dernier permet le passage des peptides du cytosol à la lumière du RE. Il est, plus précisément, formé par les segments transmembranaires (TM) 1 à 6 de TAP1 et 1 à 5 de TAP2. Selon plusieurs études, ils seraient alignés selon l'orientation tête-tête/queue-queue, ce qui est en opposition avec l'organisation des domaines transmembranaires de la P-glycoprotéine (Vos *et coll.*, 2000; Loo et Clarke, 1995). Cette orientation implique que les domaines transmembranaires de TAP1 sont symétriques à ceux de TAP2, ce qui signifie que l'angle dans lequel les segments transmembranaire de TAP1 pénètre la membrane est le miroir de l'angle de pénétration des segments de TAP2. Cependant, une récente étude de Velarde *et coll.*, a montré que les deux domaines transmembranaires avaient plutôt un angle de rotation de 180° au lieu d'une image symétrique, ce qui pourrait impliquer une organisation tête-queue, tête-queue. Ceci a d'ailleurs été observé dans d'autres hétérodimères de la famille ABC.

**Figure 2 :** Représentation des trois domaines de chacune des sous-unités du transporteur TAP





Adapté de : Lankat-Buttgereit et coll., 2002

L'orientation des domaines transmembranaires est donc une question qui reste à résoudre, puisque les techniques utilisées jusqu'à présent, dans les études ne permettaient pas une assez grande résolution pour connaître l'orientation de chaque segment individuellement (Velarde *et coll.*, 2001; Ford *et coll.*, 1990; Zouni *et coll.*, 2001).

Le premier segment transmembranaire des deux sous-unités contient les séquences signal nécessaires pour maintenir le complexe TAP à l'intérieur du RE. Bien qu'il y ait très peu de choses connues en ce qui a trait à l'assemblage des deux sous-unités pour la formation du complexe TAP, (Revue par : Elliot, 1997) il a quand même été démontré par Vos *et coll.* que les segments transmembranaires 2 à 6 de TAP1 et les segments 1 à 5 de TAP2 sont essentiels pour la co-association et que TAP2 stabilise le sixième segment transmembranaire de TAP1 (Velarde *et coll.*, 2001; Vos *et coll.*, 2000; Vos *et coll.*, 1999). Un second site de dimérisation a également été identifié. Celui-ci est situé entre le pore et la région de liaison à l'ATP, ce qui permet la liaison des domaines de liaison peptidique ancrés à la membrane via les segments 7 et 8 de TAP1 et les segments 6 et 7 de TAP2 (Vos *et coll.*, 1999).

De plus, la liaison peptique à TAP est sensible à la température (Nijenhuis *et coll.*, 1996). Des expériences ont démontré qu'une température ambiante a un effet stabilisant sur les dimères TAP-CHMI et que cela induit plus facilement le transport des peptides à la surface cellulaire (Momburg et Hammerling, 1998; Ljunggren *et coll.*, 1990; Schumacher *et coll.*, 1994).

Les domaines de liaison nucléotidique liés aux domaines hydrophobiques contiennent deux motifs conservés qui sont situés dans le cytoplasme : Walker A (boucle p ou « p-loop ») et Walker B pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Le motif Walker A forme une boucle qui se lie au  $\alpha$ - et  $\beta$ - phosphates des di- ou tri-nucléotides (Gaudet et Wiley, 2001). Des mutations dans les résidus Walker A de TAP1 ou TAP2 interfèrent avec le transport peptidique (Arora *et coll.*, 2001; Lapinski *et coll.*, 2001;

Alberts *et coll.*, 2001). Le domaine de liaison à l'ATP de TAP 1 est le principal accepteur de l'ATP (Velarde *et coll.*, 2001).

### 3.3. TAP effectue un transport actif

Deux hypothèses ont été initialement émises pour comprendre le fonctionnement de TAP. En premier, celui-ci pourrait agir comme un véritable transporteur; c'est-à-dire que le peptide se lie à TAP et que celui-ci le transporte à travers la membrane du réticulum. La deuxième possibilité stipule que TAP pourrait agir comme canal à peptide, faisant traverser les peptides grâce à un gradient de concentration. Les deux hypothèses pouvaient s'avérer justes, puisque les deux mécanismes sont employés par des transporteurs ABC. En ce qui a trait à TAP, les études tendent à démontrer, jusqu'à présent, que la première hypothèse est celle qui est applicable. En effet, van Endert *et coll.* ont démontré que l'efficacité du transport des peptides était en étroite corrélation avec l'affinité des différents peptides pour TAP (van Endert *et coll.*, 1994). Ainsi, si TAP agissait comme une pompe, l'affinité peptidique n'aurait pas une aussi grande importance. TAP agit donc comme un véritable transporteur et effectue ce transport activement.

Le transport par TAP nécessite l'hydrolyse de l'ATP strictement, puisque des analogues de l'ATP non-hydrolysable ne peuvent promouvoir le transport des peptides. Cependant, en plus de l'ATP, l'uracile triphosphate (UTP), le cystéine triphosphate (CTP) et le guanosine triphosphate (GTP) peuvent fournir l'énergie nécessaire pour le déplacement des peptides du cytosol à la lumière du RE (Androlewicz *et coll.*, 1993).

L'ADP et l'ATP ont des affinités similaires pour les deux NBD de TAP. Cependant, si l'ADP se lie à la place de l'ATP, cela aura pour effet d'inhiber le transport peptidique. TAP possède une activité ATPase hydrolysant l'ATP en ADP, ce qui procure l'énergie nécessaire pour le transport des peptides. L'activité ATPase

de TAP est substrat spécifique et, est intimement liée avec la liaison peptidique. Cependant, certains peptides liant TAP ne sont pas transportés par celui-ci, puisqu'ils ne stimulent pas l'activité ATPase de TAP (Gorbulev *et coll.*, 2001). Les deux NBD sont essentiels pour la fonction de TAP et une mutation dans un ou l'autre des NBD risque de mener à une perte de l'activité du transporteur (Chen *et coll.*, 1996). Il a été déterminé que l'hydrolyse dans le premier site (point de départ) permet le transport peptidique et qu'ensuite, l'hydrolyse dans le deuxième site permet de terminer le cycle de transport (Chen *et coll.*, 1996; Lapinski *et coll.*, 2001; Saveanu *et coll.*, 2001).

La liaison et le transport peptidique dépendent de l'habilité des deux NBD à lier les nucléotides mais le NBD de TAP1 et celui de TAP2 ont des fonctions distinctes l'une de l'autre (Alberts *et coll.*, 2001). Ainsi, les capacités de TAP1 et TAP2 à lier l'ATP, sont différentes. Pour déterminer cela, Alberts *et coll.* ont utilisé des variants de TAP dans lesquels une des deux chaînes portait des mutations dans le site de liaison à l'ATP. Leur conclusion est que l'ATP se lie presque exclusivement à la sous-unité TAP1 de l'hétérodimère, alors que l'ADP se lie aux deux sous-unités (Karttunen *et coll.*, 2001).

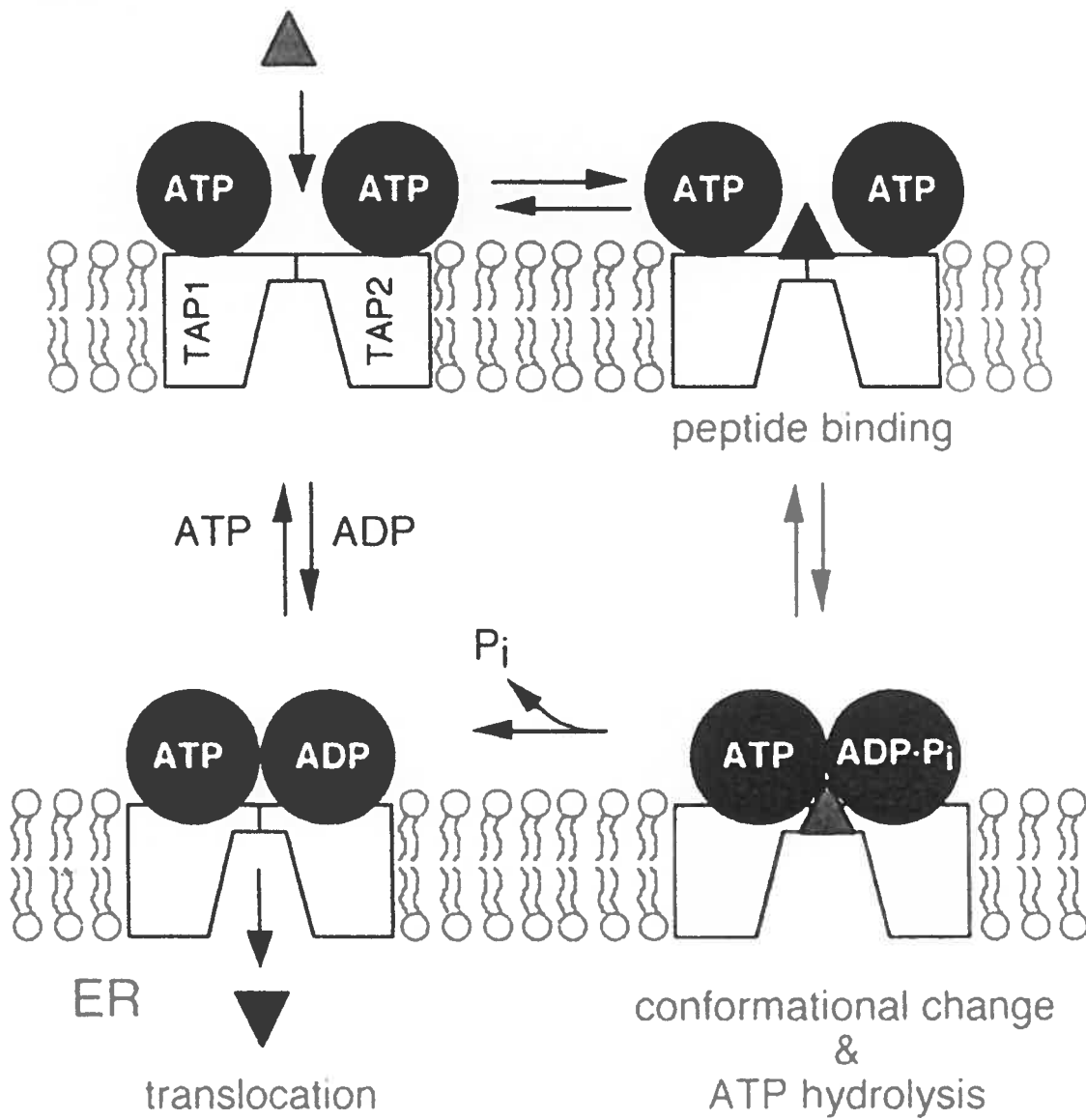
L'observation que la liaison de l'ATP aux NBD permet le relâchement du peptide et ce, même sans hydrolyse, suggère fortement que la liaison de l'ATP aux NBD induit un changement de conformation du complexe TAP. C'est cette transformation qui entraînerait une forte ou une faible affinité peptidique. Parallèlement, la stimulation de l'activité ATPase est corrélée avec le motif des peptides (Alberts *et coll.*, 2001; van Endert, 1999) et l'ATP stabilise la structure du complexe TAP grâce à un réarrangement de la conformation (Gorbulev *et coll.*, 2001; van Endert, 1999).

Le cycle du transport par TAP peut-être résumé en 4 étapes (voir figure 3). En premier, l'ATP et le peptide se lient de façon indépendante au complexe TAP (Gorbulev *et coll.*, 2001; Uebel *et coll.*, 1995). L'ATP lie le NBD de TAP1 alors que

l'ADP est lié à celui de TAP2. Cet état facilite la liaison peptidique et initie l'hydrolyse de l'ATP en réponse à la liaison d'un peptide. Cela nous mène ensuite à la seconde étape du transport. Le chargement du peptide est transmis aux NBD via un lent changement de conformation qui est nécessaire pour l'hydrolyse de l'ATP (Gorbulev *et coll.*, 2001). Les complexes TAP phosphorylés sont capables de lier les peptides mais pas de les transporter (Li *et coll.*, 2000). Troisièmement, l'hydrolyse de l'ATP dans TAP1 fait débiter le transport du peptide vers le RE. Cela provoque également le relâchement de l'ADP par TAP2. En d'autres mots, TAP1 est lié à un nucléotide et TAP2 est libre. Une molécule d'ATP va donc se lier au site catalytique de TAP2 et l'hydrolyse de cette molécule va permettre de compléter le transport du peptide. Ensuite, la molécule d'ADP liée à TAP1 va être relâchée. Cet état est non permissif pour le complexe de chargement et tant qu'une autre molécule d'ATP ne se lie pas à TAP 1, le CMH I lié avec un peptide ne peut se séparer du complexe de chargement. Une fois qu'une molécule d'ATP se lie à TAP1, le CMH I peut être libéré du complexe et l'hétérodimère TAP reprend sa conformation initiale, ce qui termine la quatrième étape (Alberts *et coll.*, 2001) (figure 3).

Les nucléotides qui se lient aux NBD le font plus spécifiquement à la partie Walker A. Il a été démontré par Saveanu *et coll.* que la présence d'une substitution nucléotidique d'une lysine pour une méthionine au codon 544 de TAP1 (TAP1K544M) ou TAP2K509M ou d'une délétion dans la séquence Walker A empêche la liaison des nucléotides et donc, par le fait même, arrête le transport (Saveanu *et coll.*, 2001; Lapinski *et coll.*, 2001). La mutation R659Q dans TAP1 affecte quant à elle le passage de l'hydrolyse de l'ATP à l'étape du transport (Gaudet et Wiley, 2001). Des mutations à l'intérieur de la séquence Walker A de TAP1 n'empêche pas la liaison peptidique. Par opposition, des mutations dans TAP2 inhibent la liaison peptidique. Par ailleurs, des essais sur la capacité de variants de TAP à lier l'ATP ont démontré que la substitution du résidu lysine en position 7 dans la séquence de Walker A par une histidine abolit la liaison des nucléotides dans TAP1 et TAP2. De plus, toutes les mutations qui abolissent la liaison nucléotidique diminuent le transport peptidique (Knittler *et coll.*, 1999; Alberts *et coll.*, 2001).

**Figure 3 :** Le cycle du transport des peptides par le transporteur TAP, illustrant l'action de l'ATP sur les deux sous-unités du complexe



Tiré de : Lankat-Buttgereit et Tampe, 2002

Plusieurs autres mutations ont été identifiées pour inhiber la liaison nucléotidique. Ainsi, le remplacement des glycines en position 1 et 6 de Walker A, dans la séquence d'a.a. GXXGXGKS/T, pour une valine ou une sérine, et ce dans les deux sous-unités bloque complètement la liaison nucléotidique et le transport peptidique (Alberts *et coll.*, 2001; Knittler *et coll.*, 1999). Cependant, cela ne bloque pas la capacité du complexe TAP à lier les molécules du CMH de classe I. Il y a également les résidus 2 et 3 de la séquence Walker A qui ne peuvent pas être remplacés par une sérine comme c'est pourtant le cas chez la majorité des transporteurs ABC procaryotes et eucaryotes (Alberts *et coll.*, 2001).

Ainsi, des mutations dans les NBD peuvent affecter la liaison et le transport peptidique. Cependant, d'autres facteurs peuvent également influencer la liaison et le transport peptidique, comme la séquence d'acides aminés des peptides et les domaines transmembranaires.

### 3.4. L'affinité peptidique

#### 3.4.1. La sélection des acides aminés

TAP lie et transporte préférentiellement les peptides d'une longueur de 8 à 16 a.a. (Koopmann *et coll.*, 1996). Les peptides de plus de 40 a.a. seront aussi transportés, mais l'efficacité du transport sera diminuée (Ritz et Seliger, 2001; Koopmann *et coll.*, 1996) puisqu'ils sont trop longs pour être transmis directement aux molécules du CMH de classe I. Les peptides de 16 a.a. et plus sont tout de même liés par TAP car leur affinité est plus grande que celle des épitopes matures. Ces peptides trop longs (« NH<sub>2</sub>-terminal extended ») ont généralement le bon groupement C-terminal pour leur liaison au CMH de classe I mais leur terminaison en NH<sub>2</sub>-terminal est trop longue. La conversion de ces précurseurs NH<sub>2</sub>-terminal longs en épitopes matures (de la longueur appropriée pour la liaison au CHM de classe I) est effectuée par des aminopeptidases que l'on nomme ERAP1 et qui se situent dans le RE (Saric *et coll.*, 2002, York *et coll.*, 2002).



La longueur des peptides qui sont liés par TAP correspond donc sauf dans le cas des peptides « NH<sub>2</sub>-terminal extended » à celle que lie les molécules du CMH de classe I (Momburg et Hammerling, 1998).

Les peptides destinés à être liés par TAP proviennent surtout de protéines nouvellement synthétisées (Reits *et coll.*, 2000). La sélection peptidique est, entre autre, influencée par les acides aminés en C-terminal (COOH-terminal) et les trois premiers résidus amino-terminal (NH<sub>2</sub>-terminal). Les acides aminés entre ces deux zones ne contribuent pas de manière significative à la sélectivité peptidique mais sont nécessaires pour leur reconnaissance par le CMH et par les récepteurs des CTL (Revue par : Lankat-Buttgereit et Tampe, 1999). La région en C-terminale joue un rôle important puisque c'est souvent cette partie qui vient s'ancrer dans le domaine de liaison aux peptides des molécules de CMH de classe I. Ce motif permet une plus grande diversité dans la présentation peptidique aux CTL (Uebel et Tampe, 1999). Momburg *et coll.* ont déterminé que le complexe TAP1-TAP2 préférait les peptides avec des résidus hydrophobes en C-terminal à ceux qui sont polaires (Momburg et Hammerling, 1998). Mentionnons que TAP peut quand même lier les peptides qui n'ont pas de résidus hydrophobes en C-terminal. Ainsi, par exemple, TAP peut lier des peptides avec de l'acide glutamique en C-terminal mais dans ce cas-là, la séquence entière du peptide va influencer la sélectivité (Momburg et Hammerling, 1998; Androlewicz *et coll.*, 1994). La présence de certains acides aminés (a.a.) à des positions spécifiques peut aussi influencer positivement ou négativement le transport. Ainsi, en comparant la présence d'une leucine par rapport à celle d'une asparagine en position 5 d'un peptide de 10 a.a., on peut constater un fort impact inhibiteur sur le transport peptidique (Momburg et Hammerling, 1998; Gournier *et coll.*, 1995). En général, c'est la sous-unité TAP2 qui influence de manière plus importante la sélection d'acides aminés avec un domaine C-terminal hydrophobe (Armandola *et coll.*, 1996).

Des études sur la capacité de liaison peptidique de TAP ont démontré que cette liaison, en plus de dépendre de la séquence en acides aminés, dépend également

de la température et du pH à laquelle s'effectue la procédure, ainsi que de la séquence des domaines de liaison peptidique de TAP. Il a donc été déterminé qu'en augmentant la température à 55°C et ce durant 5 minutes, l'efficacité de liaison est diminuée de 45%. Le pH est quant à lui optimal à 7.8 et des pH extrêmes affectent le relâchement des peptides de 80% (Nijenhuis *et coll.*, 1996; van Endert *et coll.*, 1994).

En général, TAP1 et TAP2 sont requis pour la formation du site de liaison peptidique. Des études utilisant des peptides dans lesquels une chaîne photo activable a été introduite ont démontré que les peptides interagissaient avec les deux sous-unités du complexe TAP. (Nijenhuis *et coll.*, 1996; Androlewicz *et coll.*, 1994). La majorité des études qui ont étudié la spécificité du transport effectué par TAP ont démontré que certaines mutations ont un impact sur le transport peptidique. Il existe par contre quelques études qui ne sont pas en accord avec cela, comme par exemple l'étude de Obst *et coll.*(1995). Des mutations dans les domaines de liaison peptidique de TAP peuvent également influencer la liaison et le transport des peptides par TAP. Ritz *et coll.* ont d'ailleurs identifié des séquences de TAP1 qui sont essentielles pour le transport. En effet, il a été trouvé qu'une délétion entre les résidus 366 et 405 bloque le transport, mais que des délétions en amont ou en aval de cette région n'ont aucune influence sur le transport (Ritz *et coll.*, 2001). En ce qui concerne TAP2, trois sites ont été identifiés pour leur possible implication dans la sélection des peptides, soient : les acides aminés TAP2 217,218; 262,265,268; et 374,380. Une mutation à la position 374 (Alanine→ Thréonine) de TAP2 a également été identifiée pour modifier la spécificité du transport (Vos *et coll.*, 1999; Momburg *et coll.*, 1996). De plus, des résidus situés entre les positions 452 à 748 pour TAP1 et 399 à 686 pour TAP2 sont nécessaires pour la formation de l'hétérodimère et par conséquent, à la formation du pore (Lapinski *et coll.*, 2000). Des mutations dans ces régions peuvent entraîner des conséquences importantes sur la fonction de TAP.

Donc, la séquence des peptides ainsi que la séquence des gènes TAP ont une influence sur le transport des peptides du cytosol jusqu'au CMH de classe I.

### **3.4.2. Facteur génétique affectant l'efficacité de la présentation des peptides par TAP au CMH de classe I**

Selon les allèles du CMH qu'un individu possède, le transporteur TAP transmettra plus ou moins bien les peptides. Ainsi, avec les allèles HLA (human leucocyte antigen)-A3, -A24 ou -B27, TAP présente efficacement les peptides. Les molécules, résultant de l'expression de ces allèles, n'auront par la suite aucune difficulté à aller présenter les peptides aux CTL. Par contre, la présentation est inefficace lorsque ce sont les allèles HLA-A2, -B7 ou -B8 qui sont présents (Brusic *et coll.*, 1999).

Ainsi, certains allèles du HLA permettent une meilleure efficacité de transport peptidique entre le HLA et TAP. De plus, certaines mutations dans les gènes HLA peuvent empêcher le chargement des peptides par TAP sur le complexe du CMH. Par exemple, le changement d'une thréonine pour une lysine en position 134 de l'allèle HLA-A2 rend impossible l'interaction entre le complexe TAP et HLA (Li *et coll.*, 1997; Peace-Brewer *et coll.*, 1996; Lewis *et coll.*, 1998).

Donc, l'accomplissement de la fonction de TAP, c'est-à-dire le chargement des peptides sur les molécules du CMH, nouvellement synthétisées, peut-être influencé par des facteurs extérieurs à TAP comme les allèles HLA ou par la génétique même de TAP.

## **4. Les gènes TAP1 et TAP2**

### **4.1. La structure génomique des gènes TAP**

Le transporteur des antigènes apprêtés est codé par deux gènes, les gènes TAP1 et TAP2. Ceux-ci sont situés sur le chromosome 6 dans la région des gènes du CMH de classe II. Les gènes TAP sont en association avec les gènes codant pour une partie du protéasome, les gènes LMP2 et LMP7 (voir figure 4).

Les gènes TAP1 et TAP2 comprennent respectivement environ 8 et 10 kilobases, ainsi que 11 exons chacun. Lorsqu'on compare les deux gènes, on remarque que huit des exons de TAP1 ont la même longueur que leur équivalent dans le gène TAP2, mais que la taille des introns varie de façon assez significative. Les trois exons qui ont une longueur différente sont les exons 1, 9, et 11 et diffèrent par 100, 3 et 78 nucléotides respectivement. Les onze frontières introns/exons sont identiques et suivent la règle du GT/AT pour l'épissage (Beck *et coll.*, 1992).

Les protéines TAP1 et TAP2 montrent, de façon globale, une homologie d'acides aminés de seulement 64%. Cette similarité est de 100% dans la région codée par les exons 8 et 10 qui représente les domaines de liaison nucléotidique. Ceci suggère que ces deux gènes ont évolué à partir d'un ancêtre commun par duplication lors du développement du système immunitaire chez les vertébrés (Beck *et coll.*, 1992).

#### **4.2. La régulation des gènes TAP**

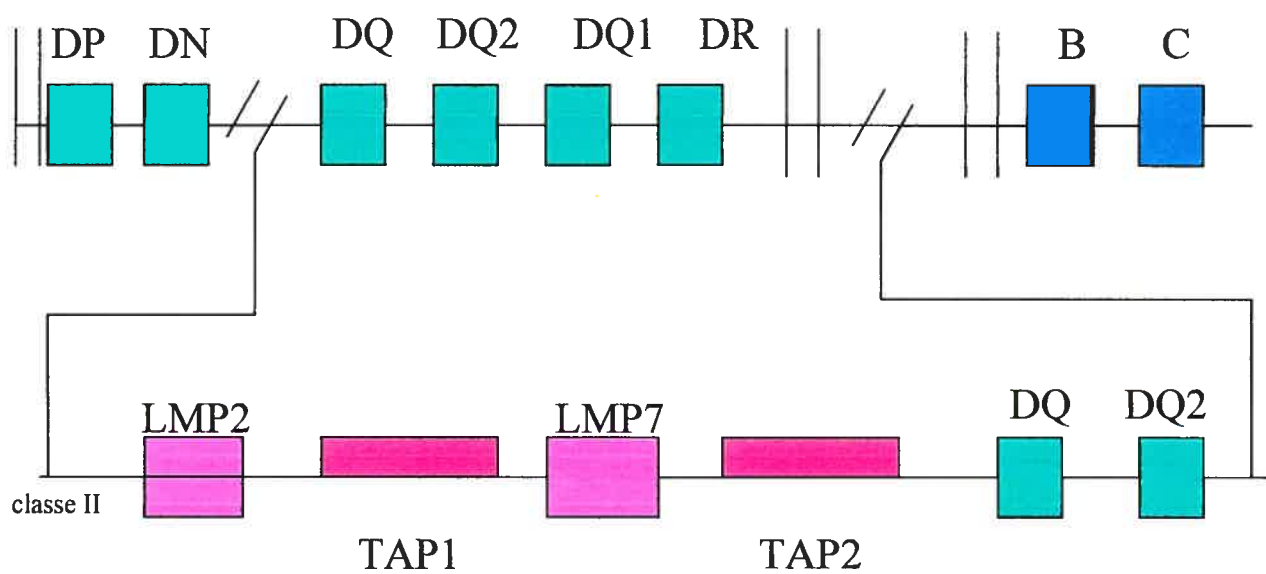
La région en 5' des gènes TAP contient les informations nécessaires pour l'initiation de la transcription. Les gènes TAP ne contiennent pas la boîte TATA, normalement présente en amont des gènes eucaryotes. En remplacement de cette boîte, ils contiennent 2 éléments riches en GC (séquence d'ADN reconnu (SP1)).

Un d'entre eux, la boîte NF- $\kappa$ B, est située en amont de la base 131 de l'exon 1 et l'autre, la boîte SP/GC, est localisée en amont du 117<sup>ième</sup> nucléotide (Elliot, 1997; Beck *et coll.*, 1992). Une mutation dans le site de la boîte SP/GC de TAP1 mène à une réduction importante du seuil de la transcription (Elliot, 1997; Beck *et coll.*, 1992). Le site NF- $\kappa$ B est quant à lui, important pour l'induction de l'activité du promoteur (Cramer *et coll.*, 2000).

**Figure 4 :** Représentation de la localisation des gènes TAP1 et TAP2 dans la région des gènes du CMH de classe II, situé dans le chromosome 6

CMH de classe II

CMH de classe I



Tiré d'après : Alberts et coll., 1997

En plus de ces deux sites régulateurs, il y a également un élément de réponse stimulé (ISRE) par les interférons  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) qui est situé en 5' du 198<sup>ième</sup> nucléotide pour TAP1 et du 573<sup>ième</sup> pour TAP2 ( Revue par : Elliot, 1997; Beck *et coll.*, 1992). La transcription peut-être sur-réglée par IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  et par les facteurs nécrosant les tumeurs  $-\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Le ISRE travaille conjointement avec la boîte NF- $\kappa$ B pour la régulation de l'expression de TAP.

La majorité des études sur la régulation des gènes TAP a été effectuée à partir du gène TAP1. L'expression de TAP1 est régulée par un promoteur bidirectionnel partagé avec le gène LMP2, qui est inductible par les interférons (Cramer *et coll.*, 2000). Ainsi, pour TAP1 cinq éléments sont présents pour la régulation de l'expression du gène. Il y a le promoteur bidirectionnel Tap1/LMP2, les sites NF- $\kappa$ B, SP/GC et une combinaison d'un ISRE avec un élément d'activation à IFN- $\gamma$ . Cette dernière région est importante pour la régulation du promoteur bidirectionnel inductible par les IFN- $\gamma$  (Cramer *et coll.*, 2000).

En plus d'être augmenté par les IFN- $\beta$  et  $-\gamma$ , l'expression de TAP1 est aussi augmentée par la protéine p53 et les agents de l'ADN endommagé, mais est diminuée par l'interleukine-10 (Il-10). L'induction de TAP1 par l'ADN endommagé est p53-dépendant puisque TAP1 n'est pas induit dans les cellules où le p53 n'est pas fonctionnel. Les nouvelles protéines TAP1 induites par le p53 augmentent le transport des peptides au CMH I et par conséquent, l'expression de ceux-ci à la surface cellulaire. La voie du CMH de classe I est critique pour la surveillance contre les tumeurs, ce qui pourrait expliquer le fait que le p53 augmente l'expression de TAP1. Zhu *et coll.* ont également trouvé que le p73, un homologue du p53, est lui aussi capable d'induire l'expression de TAP1 en coopérant avec le p53 (Zhu *et coll.*, 1999). Il semble que la régulation de l'expression de TAP2 soit semblable à celle de TAP1 (Revue par : Elliot, 1997).

### 4.3. Les régions exprimées par chaque exons

Après les sites régulateurs, on retrouve sur la séquence d'ADN l'exon 1. Celui de TAP1 code pour des modules spécifiques de la région N-terminale de la protéine qui comprend entre autre quatre sites de glycolysation. Pour TAP2, l'exon 1 code pour la région N-terminale. Le pore est quant à lui codé par les exons 2 à 4. Le domaine de liaison peptidique de TAP1 est codé par la fin de l'exon 5, l'exon 6 et le début de l'exon 7 (Ritz *et coll.*, 2001); et celui de la sous-unité protéinique de TAP2 est codé, plus particulièrement, par les exons 5 et 6 mais également par une partie des exons 4 et 7 (Vos *et coll.*, 1999). Le dernier grand domaine des deux sous-unités, soit le domaine de liaison à l'ATP, est codé par les exons 8 et 10. La partie Walker A est codée par l'exon 8 et la partie Walker B est codé par l'exon 10. Cela est valable pour le gène TAP1 et TAP2. L'exon 9 et, une partie de l'exon 7 codent, quant à eux, pour 2 modules hydrophiles dans le domaine de liaison nucléotidique. Finalement, l'exon 11 des 2 gènes code pour la région ABC terminale de leur protéine (Revue par : Elliot, 1997).

### 4.4. Polymorphismes dans les gènes TAP

Depuis la découverte des gènes TAP1 et TAP2, plusieurs recherches se sont portées sur l'étude du polymorphisme de ces deux gènes et ainsi, plusieurs sites polymorphes ont été trouvés, et ce, autant dans les exons que dans les introns. Des mutations ont été découvertes dans la majorité des exons de TAP1 et de TAP2. Une mutation est une modification permanente dans l'ADN due au fait qu'un des processus de conservation de l'ADN ait fait défaut. Les mutations qui sont connues dans la littérature jusqu'à ce jour sont indiquées dans le tableau 1 pour TAP1 et dans le tableau 2 pour TAP2. Un fait à mentionner, est que la majorité des études effectuées sur le polymorphisme des gènes TAP se sont effectuées chez des Caucasiens. En effet, seulement deux études ont pris comme sujets des Africains qui provenaient du Rwanda et du Zambie (Tang *et coll.*, 1998; Tang *et coll.*, 2001). Les mutations rencontrées jusqu'à présent ont été trouvées dans les deux populations.



Tableau 1 : Polymorphismes déjà connus dans les régions codantes de TAP1

Location	Substitution nucléotidique	Changement d'acide aminé	Référence
Codon 254	GGC-GGT	Gly-Gly	(Szafer <i>et coll.</i> , 1994)
Codon 333	ATC-GTC	Ile-Val	(Colonna <i>et coll.</i> , 1992)
Codon 370	GCT-GTT	Ala-Val	(Aoki <i>et coll.</i> , 1993)
Codon 458	GTG-TTG	Val-Leu	(Jackson et Capra, 1993)
Codon 518	GTC-ATC	Val-Ile	(Yan <i>et coll.</i> , 1997)
Codon 637	GAC-GGC	Asp-Gly	(Colonna <i>et coll.</i> , 1992)
Codon 648	CGA-CCA	Arg-Gln	(Jackson et Capra, 1993)
Codon 659	CGG-CAG	Arg-Gln	(Chen <i>et coll.</i> , 1996)
Codon 661	CCG-CCA	Pro-Pro	(Szafer <i>et coll.</i> , 1994)

**Tableau 2** : Mutations répertoriées pour les régions codantes du gène TAP 2

Location	Substitution nucléotidique/ <i>Délétion</i>	Changement d'acide aminé	Référence
Codon 164	GTC-GTT	Val-Val	Nolan
Codon 253	GTT-GTC	Arg-Stop	(De la Salle <i>et coll.</i> , 1994)
Codon 326	A	Ala-Ala	(Moins-Teisserenc <i>et coll.</i> , 1999)
Codon 374	GCC-ACC	Ala-Thr	(Tang <i>et coll.</i> , 1998)
Codon 379	GTA-ATA	Val-Ile	(Bahram <i>et coll.</i> , 1991)
Codon 386	GGG-GGT	Gly-Gly	(Cano et Baxter-Lowe, 1995)
Codon 436	AAC-AAT	Asn-Asn	(Tang <i>et coll.</i> , 1998)
Codon 458	ACG-ACA	Thr-Thr	(Tang <i>et coll.</i> , 1998)
Codon 466	GGG-GGA	Gly-Gly	(Tang <i>et coll.</i> , 1998)
Codon 467	GTT-ATT	Val-Ile	(Tang <i>et coll.</i> , 1998)
Codon 513	GCT-TCT	Ala-Ser	(Tang <i>et coll.</i> , 1998)
Codon 565	GCT-ACT	Ala-Thr	(Powis <i>et coll.</i> , 1993)
Codon 577	ATG-GTG	Met-Val	(Keicho <i>et coll.</i> , 1999)
Codon 604	GGA-GGG	Gly-Gly	(Keicho <i>et coll.</i> , 1999)
Codon 651	CGT-TGT	Arg-Cys	(Szafer <i>et coll.</i> , 1994)
Codon 665	ACA-GCA	Thr-Ala	(Colonna <i>et coll.</i> , 1992)
Codon 687	TAG-CAG	Stop-Gln	(Carrington <i>et coll.</i> , 1993)
Codon 697	GTG-GTT	Val-Val	(Colonna <i>et coll.</i> , 1992)

L'influence de ces mutations sur l'activité et/ou la spécificité de la liaison peptidique varie selon les études. Par exemple, pour la mutation en position 374 de TAP2, il y a des études qui mentionnent qu'elle altère le transport (Armandola *et coll.*, 1996), alors que d'autres sont en désaccord avec cette affirmation (Obst *et coll.*, 1995). Les mutations aux codons 565 et 665 pour TAP2 entraînent la présence de nouveaux sites de phosphorylation qui pourrait influencer le transport peptidique (Li *et coll.*, 2000). Certaines des mutations connues ont permis de déterminer une nomenclature allélique

reconnue par l'organisation mondiale de la santé (OMS) (WHO international committee) (<http://www.anthonynolan.org.uk:80/HIG/>). Les allèles ont été déterminés par les polymorphismes qui affecte la structure de la protéine.

Ainsi, jusqu'à présent comme il est illustré dans le tableau 3, six allèles sont reconnus dans la littérature pour TAP1, soient : TAP1\*0101 qui est l'allèle sauvage, TAP1\*0102N qui contient une délétion d'une guanine en position 200, TAP1\*02011 qui diffère de l'allèle sauvage par la présence d'une valine (Val) en codon 333 au lieu d'une Isoleucine (Ile) et d'une glycine (Gly) au codon 637 au lieu d'une asparagine (Asp). TAP1\*02012 est, pour sa part, similaire à TAP1\*02011 mais en plus des mutations sus-mentionnées, on retrouve au codon 661 une mutation silencieuse au niveau de la proline (Pro). Finalement, l'allèle TAP1\*0301 est déterminé par la présence d'une valine en 333 à la place de l'isoleucine et l'allèle TAP1\*0401 possède une valine en 333, une glycine en 637 au lieu d'une asparagine et une glutamine (Gln) en 648 à la place d'une arginine (Arg) (Jackson et Capra, 1993). Deux nomenclatures sont utilisées dans la littérature soit celle qui est officielle et qui vient d'être mentionnée ou une nomenclature qui utilise les lettres A à E pour identifier ces allèles. Dans le tableau 3, on retrouve les deux nomenclatures.

Tableau 3 : Les différents allèles de TAP1 basés sur les substitutions d'acides aminés

Allèles	Substitutions des acides aminés				
	Codon 333 Ile→ Val	Codon 458 Val→ Leu	Codon 637 Asp→ Gly	Codon 648 Arg→ Gln	Codon 661 Pro→ Pro
Tap1*0101 TAP1*A	Ile	Val	Asp	Arg	Pro
Tap1*0102N	Ile	Val	Asp	Arg	Pro
Tap1*02011 TAP1*B	Val	Val	Gly	Arg	Pro
Tap1*02012 TAP1*E	Val	Val	Gly	Arg	Pro
Tap1*0301 TAP1*C	Val	Val	Asp	Arg	Pro
Tap1*0401 TAP1*D	Val	Leu	Gly	Gln	Pro

L'allèle sauvage est l'allèle TAP2\*0101. L'allèle TAP2\*0102 est défini par la présence d'une thréonine (Thr) au codon 565. L'allèle TAP2\*0103 est caractérisé par la présence d'une cystéine (Cys) qui remplace l'arginine au codon 651 (Cano et Baxter-Lowe, 1995). Quant à l'allèle TAP2\*0201, on retrouve au codon 665 une alanine au lieu d'une thréonine et au codon 687, une glutamine à la place d'un codon stop, ce qui allonge la transcription (Colonna *et coll.*, 1992). En ce qui à trait aux allèles non reconnu par l'OMS, on retrouve entre autre les allèles TAP2C et TAP2D. L'allèle TAP2C se défini par une valine au codon 379 au lieu d'une isoleucine (Szafer *et coll.*, 1994) et l'allèle TAP2D par la substitution d'une valine pour une isoleucine au codon 379 et d'une thréonine remplaçant une alanine au codon 565 (Powis *et coll.*, 1992). Selon l'allèle présent les domaines de liaison peptidique de TAP lieront des séquences d'acides aminés différentes. Ainsi, les peptides qui seront présentés au CMH de classe I seront différents.

Un nouveau polymorphisme fonctionnel impliqué dans l'épissage a également été trouvé pour le gène TAP2 et celui-ci conduit à l'allèle TAP2iso. Dans cet allèle, l'exon 11 est absent ainsi que la région 3' qui sont présents normalement dans le gène TAP2. À la place de l'exon 11, on retrouve un exon 12 et une autre région 3'. Le complexe TAP1-TAP2iso facilite la maturation des molécules du CMH I. Selon Yan *et coll.*, TAP2iso serait normalement co-exprimé avec les ARN messagers du TAP2 conventionnel (Yan *et coll.*, 1999) et la présence de cet allèle crée un nouveau patron de présentation (Ritz et Seliger, 2001).

Ainsi, les gènes TAP sont polymorphes et ont des différences alléliques, ce qui pourrait jouer un rôle dans l'association avec certaines maladies.

Tableau 4 : Affectation des allèles de TAP2 selon les substitutions d'acides aminés

Allèles	Substitutions des acides aminés				
	Codon 379 Val→ Ile	Codon 565 Ala→ Thr	Codon 651 Arg→ Cys	Codon 665 Thr→ Ala	Codon 687 Stop→ Gln
Tap2*0101 TAP2*A	Val	Ala	Arg	Thr	Stop
Tap2*0201 TAP2*B	Val	Ala	Arg	Ala	Gln
Tap2*C	Ile	Ala	Arg	Thr	Stop
TAP2*D	Ile	Thr	Arg	Thr	Stop
Tap2*0102 TAP2*E	Val	Thr	Arg	Thr	Stop
TAP2*0103 TAP2*F	Val	Ala	Cys	Thr	Stop
TAP2*G	Val	Ala	Arg	Thr	Gln
TAP2*H	Ile	Ala	Arg	Ala	stop

## 5. Association entre TAP et maladies

Plusieurs études tentent d'associer des mutations dans les gènes TAP1 et TAP2 avec différentes maladies, quelles soient génétiques, auto-immunes, infectieuses ou de les associer avec certains cancers.

### 5.1. Les maladies génétiques

Les syndromes associés avec des déficiences dans TAP1 et TAP2 sont similaires et sont caractérisés, entre autres, par le développement d'inflammation chronique dans les voies respiratoires chez les enfants et des vasculites. Les défauts dans le complexe TAP ne sont pas mortels.

Le syndrome du lymphocyte dénudé (Bare lymphocyte syndrome) (BLS) est caractérisé par une sévère diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I (BLS type 1) ou II (BLS type 2) à la surface cellulaire. Le typage de tissus de patients atteints du BLS de type 1 a démontré que la diminution de l'expression du CMH de classe I à la surface est due à une lacune dans le complexe TAP. La maladie peut, en premier lieu, être causée par une déficience dans TAP2 qui est due à la présence prématurée d'un codon stop à la place d'une arginine au codon 253, ce qui résulte en un complexe TAP non fonctionnel (Teisserenc *et coll.*, 1997; de la Salle *et coll.*, 1994). Mentionnons que, les patients qui sont atteints du BLS de type 1 et qui possèdent ce polymorphisme sont homozygotes pour cette mutation (De la Salle *et coll.*, 1994). En second lieu, le BLS de type 1 peut être dû à deux mutations présentes dans le gène TAP1. La première mutation est une délétion d'un nucléotide au début de l'exon 2 (délétion d'un G au codon 200) et la seconde est une substitution, d'un G pour un A en 3' du site d'épissage. Ces deux mutations mènent à un changement du cadre de lecture (de la Salle *et coll.*, 1999; Furukawa *et coll.*, 1999a; Furukawa *et coll.*, 1999). La mutation dans TAP2 résulte en une maladie plus sévère que les mutations dans la sous-unité TAP1 (Ritz et Seliger, 2001).

Il a également été trouvé que des patients atteints du syndrome de Wegener, une variante du syndrome du lymphocyte dénudé, avaient une carence dans l'expression du complexe TAP. Les mutations dans la sous-unité TAP2 sont responsables de la sous-expression des molécules du CMH de classe I à la surface cellulaire (Moins-Teisserenc *et coll.*, 1999). Cette carence est due à la délétion d'une adénosine au

codon 326, ce qui résulte en un changement du cadre de lecture et entraîne la présence prématurée d'un codon stop.

## 5.2. Maladies auto-immunes et les rejets de greffes

La participation de TAP dans la susceptibilité à développer une maladie auto-immune est controversée. Pour plusieurs patients avec diverses maladies auto-immunes liées au CMH, comme le diabète de type I, le syndrome de Sjögren, et la maladie de Grave, il a été démontré qu'il y avait une diminution de la régulation du niveau d'ARN messager de TAP1 et TAP2 et ce à différents degrés (Revue par : Lankat-Buttgereit et Tampe, 2002). Ces données suggèrent qu'une transcription incorrecte des gènes TAP peut contribuer à réduire l'expression des molécules du CMH de classe I à la surface cellulaire dans les maladies auto-immunes. Les cellules n'ayant pas de molécules du CMH de classe I à leur surface risquent de devenir la cible des cellules tueuses naturelles (NK). Cependant, dans d'autres études aucune différence entre la transcription des ARN chez les patients et les contrôles n'a été observée (Kuwata *et coll.*, 1995; Maksymowych *et coll.*, 1995).

Récemment, la régulation de TAP par la phosphorylation a été examinée (Li *et coll.*, 2000). Le complexe TAP peut, comme on l'a déjà vu, lier l'ATP et les peptides, mais sans l'hydrolyse de l'ATP, cela le rend incapable de transporter les peptides. Plusieurs mutations sont des sites potentiels pour la phosphorylation. Il a été suggéré qu'une phosphorylation anormale de TAP mène à une réponse immune cytotoxique et subséquemment au développement de maladie auto-immune (revue par : Lankat-Buttgereit et Tampe, 2002).

Les observations illustrant que les différences alléliques peuvent mener à des différences dans la présentation des antigènes ont augmenté les spéculations sur une possible association entre TAP et les maladies auto-immunes impliquant le CMH de classe I (Élliot, 1997; Obst *et coll.*, 1995). Ainsi, pour le diabète de type 1, certaines études ont démontré que la présence de l'allèle TAP2\*0201 serait un facteur de



protection (Penforis *et coll.*, 2002) alors que la présence de l'allèle TAP2\*0101 serait un facteur de susceptibilité pour la maladie, mais cela est peut-être dû à un déséquilibre de liaison (Rau *et coll.*, 1997). En ce qui concerne TAP1 une association possible entre l'allèle TAP1\*0201 serait un facteur positif vers la maladie, mais d'autres études ont montré que cette association serait due à un déséquilibre de liaison (Rau *et coll.*, 1997; Caillat-Zucman *et coll.*, 1993). Il y a également les allèles TAP1\*0101/TAP1\*0301 qui ont été associés avec un facteur de risque pour le diabète de type 1 (Jackson *et coll.*, 1993).

Chez des Japonais atteints du syndrome Sjögrens, une mutation en position 577 de TAP2 (méthionine pour une valine) est connue comme un facteur génétique pouvant déterminer la susceptibilité à ce syndrome (Kumagai *et coll.*, 1997).

La maladie de Grave a, quant à elle été positivement associée avec les allèles TAP1\*0301 et TAP2\*0101, alors que l'allèle TAP1\*0401 a montré une association négative avec la maladie Grave (Rau *et coll.*, 1997).

D'autres maladies ont également été étudiées pour leur possible association avec TAP comme la maladie de Behcet, où la fréquence de l'allèle TAP2\*0101 est plus élevée chez les patients que chez les contrôles et où, en opposition, l'allèle TAP1\*0301 (Gonzalez-Escribano *et coll.*, 1995) et l'allèle TAP2\*0201 est absente chez les personnes atteintes de la maladie (Ishihara *et coll.*, 1996). Il y a également la spondylite ankylosante dans laquelle il y aurait une association entre la maladie et les allèles TAP2D et TAP2H (Konno *et coll.*, 1998;), mais cela reste encore à déterminer, il en est de même pour l'allèle TAP1\*0201 (Maksymowych *et coll.*, 1995).

Le lien, entre un allèle de TAP et la dermatite atopique, n'est pas très clair. En effet, deux études ont indiqué qu'aucune association ne pouvait être faite (Kuwata *et coll.*, 1994; Kuwata *et coll.*, 1995), mais une autre étude faite par Ismaïl *et coll.* chez

les Tunésiens, a démontré que la présence d'une glycine au codon 637 de TAP1 augmente les risques d'atopie (Ismail *et coll.*, 1997).

Deux autres maladies fréquemment étudiées pour leur association avec TAP sont l'arthrite rhumatoïde et le syndrome de Reither. Dans le syndrome de Reither, la fréquence des allèles TAP1\*0301 et TAP2\*0101 est significativement plus élevée chez les patients que chez les contrôles et cette association est indépendante d'autres facteurs génétiques tels les gènes HLA (Barron *et coll.*, 1995). En ce qui concerne l'arthrite rhumatoïde, certaines études tendent à démontrer une association entre la maladie et les gènes TAP, mais d'autres réfutent cette association. Ainsi, Tuokko *et coll.* ont montré qu'une combinaison entre les allèles TAP2J et TAP2\*0103 est positivement associée avec la maladie (Tuokko *et coll.*, 2001) alors que Takeuchi *et coll.*, Vinasco *et coll.* (1998) et Vejbaesya *et coll.* (2000) n'ont montré aucune association (Takeuchi *et coll.*, 1997a; Takeuchi *et coll.*, 1997b; Vinasco *et coll.*, 1998; Vejbaesya *et coll.*, 2000).

Finalement, plusieurs autres maladies ont été étudiées pour vérifier la présence d'une association entre ces maladies et les variants de TAP. Cependant, en ce qui concerne ces maladies, aucune association n'a pu être observée de façon significative. C'est le cas de la sarcoïdose (Ishihara *et coll.*, 1997), du lupus érythémateux systémique (Takeuchi *et coll.*, 1996; Davies *et coll.*, 1994) et de la maladie cœliaque (Powis *et coll.*, 1993b). En ce qui concerne cette dernière maladie, une première association avait été indiquée mais suite à des analyses plus poussées, il a été indiqué que l'association faite était en réalité due à un déséquilibre de liaison entre TAP et des allèles HLA de classe II (Powis *et coll.*, 1993b)

En ce qui à trait aux transplantations, très peu d'études ont analysé l'impact de TAP sur le rejet de greffes. Par contre, il a été démontré que le rejet d'un rein, après une transplantation, semble être influencé par la présence de polymorphismes dans le gène TAP2. Il apparaît que si le donneur code pour l'allèle TAP2\*0103, la

présentation des antigènes allospécifiques est amoindrie ce qui favorise l'intégration du transplant (Revue par : Lankat-Buttgereit et Tampe, 2002).

### 5.3. L'association avec les cancers

L'analyse de lésions enlevées chirurgicalement et de lignées cellulaires, le tout dérivant de tumeurs, a fourni l'évidence que les transformations néoplasiques sont fréquemment associées avec des problèmes dans l'expression de TAP (Seliger *et coll.*, 1998). En comparaison avec les tissus normaux, toutes les tumeurs typées présentaient une diminution ou un dérèglement de l'expression du gène TAP1.

Comme il a été mentionné précédemment, le p53 induit l'expression de TAP1. Puisque plus de 50% des tumeurs inhibent le p53, celui-ci n'est plus capable d'induire TAP1 ce qui peut expliquer la diminution de l'expression de TAP1 dans les tumeurs (Zhu *et coll.*, 1999). De plus, un grand nombre de tumeurs sécrètent de IL-10 qui est reconnue pour diminuer l'expression de TAP (Zeidler *et coll.*, 1997).

Dans des tumeurs cancéreuses du cerveau et des poumons un très faible niveau d'ARNm de TAP1 et TAP2 est détectable (Chen *et coll.*, 1996). La diminution de l'expression de TAP1 a également été constatée dans les carcinomes du col utérin (Evans *et coll.*, 2001), du rein (Kallfelz *et coll.*, 1999) et les lymphomes de Burkitt (Frisan *et coll.*, 1996). Dans quelques cellules tumorales cancéreuses le niveau d'ARNm de TAP peut être restauré par stimulation à l'IFN- $\gamma$ . De plus, des études avec le virus de la vaccine contenant le gène TAP1 ont démontré que ce virus pouvait réduire de façon significative les tumeurs chez les souris, ce qui laisse croire que TAP pourrait être impliqué dans la lutte contre le cancer (Seliger *et coll.*, 1998; Singal *et coll.*, 1998; Kallfelz *et coll.*, 1999). La perte de l'expression de TAP dans les tumeurs malignes semble donc être un phénomène commun (Momburg et Hammerling, 1998). Une étude de Kamarashiev *et coll.* a illustré une relation entre la diminution de l'expression de TAP1 et le potentiel oncogène des mélanomes. Ainsi, une baisse significative de l'expression de TAP1 a été associée avec le pronostique

d'oncogénicité et ce indépendamment de l'épaisseur des lésions primaires qui est habituellement utilisée pour le pronostic (Kamarashev *et coll.*, 2001).

La diminution de l'expression de TAP, et par conséquent celle des HLA de classe I à la surface cellulaire, peut être un moyen d'évasion utilisé par les tumeurs pour échapper au système immunitaire. De plus, des mutations dans les gènes TAP peuvent aussi être impliquées, comme c'est le cas dans le cancer des poumons. Une mutation dans le domaine de liaison à l'ATP, au codon 659 de TAP1, résulte en un changement d'acide aminé d'une arginine pour une glutamine (Gln), ce qui rend les cellules incapables de lier et de transporter les peptides. Cette mutation a été relevée dans toutes les cellules tumorales testées par Chen *et coll.* et est à l'origine de l'échappement au système immunitaire (Chen *et coll.*, 1996).

Un autre cancer étudié est la maladie d'Hodgkin dans laquelle les allèles de TAP1 codant pour une isoleucine en 333 prédisposent pour la maladie d'ordre familial (Harty *et coll.*, 2002).

#### **5.4. L'association avec des maladies infectieuses**

Les cellules CD8<sup>+</sup> reconnaissent et éliminent de façon efficace les cellules infectées par les virus, un processus qui requiert la présentation des peptides viraux aux CMH de classe I. Plusieurs virus persistants comme le virus Herpes simplex (HSV), le cytomégalovirus humain (HCMV), l'adénovirus et le papillomavirus humain (HPV) ont développé des stratégies pour échapper à la réponse immunitaire en bloquant la fonction de TAP (Ploegh, 1998). Par exemple, une petite protéine de 9kDa exprimée par le virus Herpes simplex, se lie à TAP et inhibe le transport peptidique effectué par celui-ci (Revue par : Elliot, 1997). Le HCMV code pour une protéine, la gpUS6, qui se lie au complexe TAP. En se liant à TAP, cette protéine empêche le transport des peptides à l'intérieur de la lumière du RE mais la gpUS6 n'empêche pas la liaison peptidique. La liaison de la gpUS6 à TAP inhibe le

changement de conformation qui doit suivre la liaison peptidique. Cette inhibition empêche l'ATP de se lier à TAP ce qui altère le transport des peptides. De plus, la liaison de la gpS6 avec TAP rend celui-ci incapable de lier les molécules du CMH de classe I. Ces deux effets de la gpS6 rendent le complexe TAP non fonctionnel (Hewitt *et coll.*, 2001; Reits *et coll.*, 2000). L'adénovirus produit, quant à lui la E3gp19K, une protéine qui se lie au complexe TAP et inhibe ainsi, la formation du complexe TAP-Tapasine-CMH de classe I (Ploegh, 1998). En ce qui concerne le papillomavirus humain (HPV), celui-ci agit sur le niveau de la protéine. En effet, HPV diminue l'expression de TAP. La protéine E7 des HPV de type 6 et 18 réprime le promoteur bidirectionnel LMP2/TAP1 (Ritz et Seliger, 2001; Georgopoulos *et coll.*, 2000). Donc, en utilisant tous ces moyens, les virus réussissent à s'implanter de façon persistante chez l'humain, puisqu'ils échappent au système immunitaire en bloquant la présentation de leurs antigènes aux molécules du CMH de classe I.

Les gènes TAP peuvent également influencer la susceptibilité à développer des infections. Ainsi, des études ont trouvé que la présence de l'allèle TAP2\*0102 est un facteur de protection contre le virus de l'hépatite C (VHC), de même que l'allèle TAP2\*0103 est associé à une progression lente de l'infection à VHC. Alors que l'allèle TAP2\*0201 est associé avec la progression de l'infection (Akuta *et coll.*, 2001; Kuzushita *et coll.*, 1999).

Il a aussi été trouvé que les allèles TAP2\*0101- TAP2\*0103 augmentent le risque de développer la tuberculose lorsqu'une personne est infectée par la mycobactérie. TAP2\*0201 a également été positivement associé avec la tuberculose lorsque la personne est HLA-DR5 négative et avec la lèpre tuberculeuse (Rajalingam *et coll.*, 1997).

Finalement, certains allèles de TAP ont, en plus, été identifiés pour être un facteur de risque ou de protection en ce qui a trait à la progression de l'infection vers le syndrome d'immunodéficience humaine (SIDA).

## **6. Le VIH et TAP**

### **6.1. Épidémiologie**

Apparu dans toutes les régions du monde il y a environ 20 ans, le VIH/SIDA est maintenant la première cause de décès en Afrique subsaharienne et la quatrième maladie la plus meurtrière dans le reste du monde. À l'échelle mondiale, environ 40 millions de personnes vivent avec le VIH/SIDA et en l'an 2001 il y a eu approximativement 5 millions de nouveaux cas. Le VIH/SIDA fait un minimum de 3 millions de morts par année (UNAIDS, 2000).

La région la plus touchée par ce fléau dans le monde est l'Afrique subsaharienne où 2.3 millions d'Africains sont décédés au courant de l'année dernière. L'Organisation des Nations Unies (ONU) estime qu'il y a 3.4 millions de nouvelles infections par année dans cette région du monde, ce qui signifie qu'il y a aujourd'hui 28.1 millions d'Africains qui vivent avec le virus, ce qui représente plus de la moitié des cas à l'échelle mondiale.

L'ONU et les gouvernements de plusieurs pays tentent de diminuer l'épidémie en organisant plusieurs programmes, notamment pour diminuer le nombre d'enfants infectés à la naissance. Au Zimbabwe, par exemple, 70% des décès chez les enfants de moins de 5 ans sont dus au SIDA.

### **6.2. Les facteurs génétiques**

Plusieurs facteurs influencent la progression de la maladie, comme l'âge au temps de l'infection, la disponibilité de médicaments et les facteurs génétiques du virus et de l'hôte.

Les facteurs génétiques de l'hôte sont des déterminants importants dans la susceptibilité à l'infection au VIH-1 et subséquemment, dans la pathogenèse du

SIDA. La majorité des études ont, jusqu'à présent, principalement centré leurs intérêts sur les gènes de deux systèmes primordiaux dans la réponse immunitaire. Il s'agit de la famille des molécules qui sont impliquées dans la présentation des antigènes ainsi que les ligands et les récepteurs des chémokines. Ces dernières ont d'ailleurs été identifiées comme cofacteurs dans l'entrée du VIH-1 à l'intérieur de la cellule (Dragic *et coll.*, 1996).

Parmi les gènes codant pour les molécules impliquées dans la présentation des antigènes, plusieurs investigations ont suggéré que les allèles du HLA et les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité sont impliqués dans la progression de la maladie. On retrouve, entre autres, dans les gènes situés à l'intérieur du locus des gènes du CMH, les gènes HLA de classe I et II, les gènes LMP, les gènes TAP, les gènes TNF et le complément.

Les facteurs nécrosant les tumeurs jouent un rôle dans l'immuno-pathogenèse du SIDA. Ils peuvent induire l'expression du HIV par une activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Pour le complément, l'allèle C4 est lié à une progression rapide de la maladie. Pour ce qui est des gènes HLA, deux haplotypes ont été associés avec une progression rapide de la maladie, soient HLA A1-Cw7-B8-DR3-DQ2 et HLA A11-Cw4-B35-DR1-DQ1 (Kaslow *et coll.*, 1996). Une association vers une progression rapide a également été trouvée avec d'autres types d'HLA : A23, A24, A26, B21 et B38. Par progression rapide, on entend qu'une personne infectée par le virus va développer le SIDA deux à trois ans après l'infection, comparativement à 10 ans lors d'une progression normale vers le SIDA et ce, sans que le patient ne soit soumis à une thérapie anti-rétrovirale (Kaslow *et coll.*, 1996).

En ce qui a trait aux gènes TAP, la présence d'une isoleucine en position 379 de TAP2 avec l'allèle HLA A29 ou B8 accélère la progression vers le SIDA (voir tableau 5). La présence d'une alanine en 665 de TAP2 avec l'allèle HLA A28 est également associée avec une progression rapide de la maladie. De plus, l'alanine en 665 ou l'isoleucine en 379 de TAP2 associés avec les allèles A24 et/ou B60 du CMH

de classe I sont également associés avec une progression rapide vers le SIDA. Par contre, l'alanine en 665, avec les allèles A25, A26, A32 ou B18, est associé avec une progression lente vers le SIDA. Pour TAP1, la présence d'une valine en position 333 avec l'allèle HLA-A3 est associée avec une progression rapide (revue par : Roger, 1998; Kaslow *et coll.*, 1996; Keet *et coll.* 1997). Certains allèles de TAP ont également été associés avec des allèles du CMH de classe II. Ainsi, les allèles HLA DRB1\*1300-DQB\*0603 et HLA DRB1\*0700-DQB\*0303 associés avec une alanine au codon 665 de TAP2 sont associés avec une progression lente vers le SIDA alors qu'une valine au codon 333 de TAP1 avec les allèles HLA DRB1\*0401-DQA1\*0300-DQB1\*0301, DRB1\*1200-DQA1\*0501-DQB1\*0301, DRB1\*1300-DQA1\*0102-DQB1\*0604 ou DRB1\*1400-DQA1\*0101-DQB1\*0503 est associée avec une progression rapide de la maladie (Kaslow *et coll.*, 1996). Ces dernières associations sont plutôt surprenantes puisque le complexe TAP présente les peptides au CMH I et non aux CMH II. Ces associations sont probablement dues à un déséquilibre de liaison entre les gènes TAP et les allèles du CMH de classe II. Nous sommes en présence d'un déséquilibre de liaison lorsque des allèles de différents locus sont associés plus fréquemment qu'il ne devrait l'être. Ainsi, cette association ne serait pas due à la présence d'un allèle de TAP particulier mais plutôt à la présence des allèles du CMH de classe II (Revue par : Roger, 1998).



**Tableau 5 :** Relation entre des allèles HLA et des polymorphismes de TAP sur la vitesse de la progression du VIH vers le SIDA

Facteurs génétiques		Taux de progression
Allèles HLA	TAP	
HLA-A29 -B8 -A24 -B60	Isoleucine au codon 379 de TAP2	Rapide
HLA-A28 -A24 -B60	Alanine au codon 665 de TAP2	Rapide
HLA-A25 -A26 -A32 -B18	Alanine au codon 665 de TAP2	Lente
HLA-A3	Valine au codon 333 de TAP1	Rapide
HLA DRB1*1300-DQB*0603 HLA DRB1*0700-DQB*0303	Alanine au codon 665 de TAP2	Lente
HLADRB1*0401-DQA1*0300-DQB1*0301 HLADRB1*1200-DQA1*0501-DQB1*0301 HLA DRB1*1300-DQA1*0102-DQB1*0604 HLA-DRB1*1400-DQA1*0101-DQB1*0503	Valine au codon 333 de TAP1	Rapide

(Kaslow *et coll.*, 1996; Keet *et coll.*, 1991)

## Hypothèse et objectifs

Comme nous venons de le voir dans la dernière partie, le transporteur TAP présente les peptides antigéniques provenant du cytosol aux molécules du CMH de classe I, et par conséquent aux CTL. Cette fonction est primordiale pour contrer l'établissement de pathogènes intracellulaires et pour instaurer une réponse immunitaire adéquate. Des mutations dans les gènes TAP1 et TAP2 peuvent influencer la librairie des peptides qui seront liés par le complexe majeur d'histocompatibilité et dans une étape ultérieure aux CTL. Ces variations dans la présentation des antigènes peuvent conduire à une prédisposition à développer certaines maladies quelles soient auto-immunes, cancéreuses ou infectieuses. Ainsi, la présence d'allèles particuliers peut faciliter l'infection par certains virus.

Plusieurs mutations dans les gènes TAP ont déjà été identifiées et, pour certaines d'entre elles, une relation a été établie entre la mutation et la susceptibilité à développer une maladie particulière. La majorité des études effectuées jusqu'à présent sur les gènes TAP avaient comme sujets des populations caucasiennes. Jusqu'à aujourd'hui, très peu d'études ont tenté de caractériser le polymorphisme de la séquence complète des gènes TAP1 et TAP2 à l'intérieur de populations des pays africains en développement. Pourtant, on retrouve dans les populations africaines une plus grande diversité de la distribution allélique, étant donné la pression qui est exercée sur la sélection des allèles. Celle-ci est due aux nombreux pathogènes que l'on rencontre dans cette partie du monde comparée aux autres endroits. (Parham *et coll.* 1996) Le premier but de cette étude est donc, d'étudier le polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 dans une population africaine. La population analysée dans cette étude est un groupe zimbabwéen ancestral relativement homogène. L'étude portera sur l'analyse des 11 exons du gène TAP1 et des 11 exons du gène TAP2 dans un échantillonnage de 45 individus non apparentés. La première technique utilisée pour cette analyse est le Single Strand Conformational Polymorphisms (SSCP). Nous avons choisi d'utiliser cette dernière technique car elle permet de faire une première analyse rapide de la séquence d'ADN d'un gène et ce, sur un grand nombre

d'échantillon. Par contre, cette technique ne permettant pas de déterminer de façon précise les mutations, pour réussir à identifier les mutations nous avons ensuite utilisé le séquençage direct. Mentionnons que c'est la première fois qu'une étude sur le polymorphisme de la séquence codante complète de TAP1 et TAP2 s'effectuera dans une population Zimbabwéenne.

Diverses études sur le VIH étudient les facteurs génétiques de l'hôte dans la progression de l'infection vers le SIDA. Plusieurs de ces facteurs sont localisés sur le chromosome 6 dans le locus des gènes du CMH. Certaines mutations dans les gènes TAP ont été identifiées pour avoir un impact sur la progression de l'infection au VIH. Jusqu'à présent, les études portant sur les facteurs génétiques de l'hôte en relation avec le VIH n'ont pas analysé l'impact des mutations dans les gènes TAP, sur la susceptibilité de l'hôte à permettre l'établissement de l'infection par le VIH, dans le contexte d'une transmission hétérosexuelle. La population africaine étant le peuple le plus durement touché par l'épidémie du VIH, l'analyse du polymorphisme des gènes TAP sur la susceptibilité à établir une infection par le VIH constituera la deuxième partie de notre étude. Nous effectuerons le typage d'environ 100 individus non apparentés VIH positif et d'approximativement 100 individus non apparentés VIH négatif afin de déterminer la fréquence des mutations dans ces deux groupes.

Les mutations typées sont situées dans des régions qui sont importantes pour la fonction de TAP et ces mutations entraînent un changement d'acide aminé. Les régions particulièrement importantes pour la fonction de TAP sont le domaine de liaison peptidique et le domaine de liaison à l'ATP. Des mutations à l'intérieur des séquences d'ADN codant pour ces deux régions peuvent conduire à d'importantes répercussions sur l'accomplissement de la fonction du transporteur TAP.

Cette analyse se fera donc à l'aide de deux techniques connues soit par Amplified-Restriction Fragment Length Polymorphism (A-RFLP) et par Amplification Refractory Mutation System (ARMS). Ces deux techniques sont équivalentes. Elles permettent toutes deux de typer un grand nombre d'échantillons en peu de temps, mais le développement des tests s'effectue de façon plus aisée avec la première technique. C'est pour cette raison que nous avons développer des tests A-

RFLP pour les mutations dont aucun test n'avait été précédemment décrit dans la littérature.

L'échantillonnage testé, nous permettra dans un premier temps de déterminer la fréquence allélique des mutations typées ainsi que le génotype de chaque individu et dans un deuxième temps de vérifier s'il y a une relation entre une mutation et la susceptibilité au VIH grâce à nos deux groupes.

## Articles

**Contribution des coauteurs :**

Les personnes suivantes ont permis la réalisation des études ayant menées aux articles qui suivent. Julie Lajoie a participé à l'élaboration du devis de l'étude et a effectué l'analyse génétique sur les spécimens. Lynn Zijenah a fait l'extraction de l'ADN sur les spécimens et est une des co-investigateurs du projet Zvitambo. Marie-Claude Faucher a effectué une partie de l'analyse génétique. Brian Ward est un des co-investigateurs du projet Zvitambo et a participé au recrutement des patients. Le Dr Michel Roger est le chercheur principal du projet. Les articles ont été rédigés par Julie Lajoie et Michel Roger avec la contribution des co-auteurs.

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

LAJOIE Julie

2-500-1-0 M.SC. Microbiologie et immunologie

### 2. Description de l'article

#### Auteurs de l'article

Julie Lajoie, Lynn Zijenah, Marie-Claude Faucher, Brian Ward, Michel Roger

#### Titre de l'article

New TAP1 polymorphisms in Africans: Their potential implications on TAP function and in human diseases

#### Revue qui publie l'article et date de publication

Article soumis

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Julie Lajoie inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Étude du polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 en relation avec la susceptibilité à l'infection par le VIH dans une population Africaine.

BRIAN WARD

Nom (caractère d'imprimerie)

Signature

02/12/18

Date

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Lajoie Julie

2-500-1-0 M.SC. Microbiologie et immunologie

### 2. Description de l'article

#### Auteurs de l'article

Julie Lajoie, Lynn Zijenah, Marie-Claude Faucher, Brian Ward, Michel Roger

#### Titre de l'article

Novel TAP1 polymorphisms in indigenous Zimbabweans: Their potential implications on TAP function and in human diseases

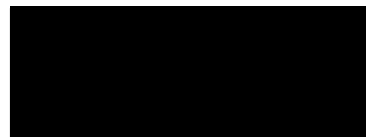
#### Revue qui publie l'article et date de publication

Article soumis

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Julie Lajoie inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Étude du polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 en relation avec la susceptibilité à l'infection par le VIH dans une population Africaine.

Michel Roger  
Nom (caractère d'imprimerie)



Signature

11 décembre 2002  
Date



## ACCORD DES COAUTEURS

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

LAJOIE Julie

2-500-1-0 M.SC. Microbiologie et immunologie

### 2. Description de l'article

#### Auteurs de l'article

Julie Lajoie, Lynn Zijenah, Marie-Claude Faucher, Brian Ward, Michel Roger

#### Titre de l'article

Novel TAP1 polymorphisms in indigenous Zimbabweans: Their potential implications on TAP function and in human diseases

#### Revue qui publie l'article et date de publication

Article soumis

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Julie Lajoie inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Étude du polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 en relation avec la susceptibilité à l'infection par le VIH dans une population Africaine.

Marie-Claude Faucher  
Nom (caractère d'imprimerie)



Signature

19 Dec 2002

Date

**DEPARTMENT OF  
IMMUNOLOGY**

P.O. Box A 178  
Avondale  
HARARE, Zimbabwe

Telephone: 263-4-791631  
Telex: 26580 UNIVZ  
Telegrams: UNIVERSITY  
Fax: 263-4-724912  
E-mail: immunolo@internet.co.zw



FACULTY OF MEDICINE

UNIVERSITY OF ZIMBABWE

**ACCORD DES COAUTEURS****1. Identification de l'étudiant et du programme**

LAJOIE Julie

2-500-1-0 M.SC. Microbiologie et immunologie

**2. Description de l'article**Auteurs de l'article

Julie Lajoie, Lynn S. Zijenah, Marie-Claude Faucher, Brian Ward, Michel Roger

Titre de l'article

New TAP1 polymorphisms in indigenous Zimbabweans: Their potential implications on TAP function and in human diseases

Revue qui publie l'article et date de publication

Article soumis

**3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Julie Lajoie inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Étude du polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 en relation avec la susceptibilité à l'infection par le VIH dans une population Africaine.

LYNN S. ZIJENAH

Nom (caractère d'imprimerie)

Signature

18 December 2002

Date

## **Novel TAP1 polymorphisms in indigenous Zimbabweans: Their potential implications on TAP function and in human diseases**

Julie Lajoie<sup>1,2</sup>, Lynn S. Zijenah<sup>3</sup>, Marie-Claude Faucher<sup>1</sup>, Brian J. Ward<sup>4</sup>, The ZVITAMBO Study Group<sup>5</sup> and Michel Roger<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

<sup>2</sup>Département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal

<sup>3</sup>*Department of immunology, University of Zimbabwe*

<sup>4</sup>Montreal General Hospital Research Institute, McGill University

<sup>5</sup>The ZVITAMBO Study Group are H Chidawanyika, P Iliff, A Mahomva, F Majo, L Malaba, M Mbizvo, L Moulton, K Mutasa, J Mutsambi, M Ndhlovu, L Proper, A Ruff, N Tavengwa, C Zunguza, P Zvandasara and Co-Principal Investigators: K Nathoo and J Humphrey.

Short title: TAP1 DNA sequence analysis in Zimbabweans

\*Address correspondence to:

Michel Roger M.D, Ph.D

Département de microbiologie, Hôpital Notre-Dame du CHUM,

1560 Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1.

Phone: (514) 890-8000 (2-5802), Fax: (514) 412-7512

E-mail address: [REDACTED]

## ABSTRACT

Although genetic variations in the locus encoding the transporter associated with antigen processing (TAP)1 have been studied in different populations from many industrialized countries, little is known of its polymorphism in populations from the developing world. Because of the essential role of TAP1 molecule in antigen processing, the implication of its polymorphism as a factor involved in human diseases and the possible genetic variation at this locus among ethnically diverse populations, we underwent a study to analyse the full extent of TAP1 polymorphism in an indigenous Zimbabwean population (Shona ethnic group). Using single stranded conformation polymorphism and DNA direct sequencing procedures, we detected the presence of 11 nucleotide sequence variations in the entire coding region of TAP1. Of these variants, eight are non conservative substitutions with respect to amino acid composition and are located in a critical part of the protein that could modulate its function. Five new polymorphic sites were identified in exon 1 (codons 7 Pro→Ser, 17 Gly→Arg, 141 Val→Val), exon 6 (codon 419 Gly→Cys), and exon 7 (codon 487 Arg→Arg). Significant differences were seen in the distribution of TAP1\*0201 and TAP1\*0401 alleles, and codon 333 (Ile→Val) polymorphism among African and non-African populations. Thus, TAP1 polymorphism has evolved differently among populations presumably because of the evolutionary pressures generated by prevalent pathogens in these geographically distinct regions.

Keywords: Zimbabwean, antigen presentation, TAP1, MHC, polymorphism

## INTRODUCTION

Major histocompatibility complex (MHC) class I molecules bind peptides in the endoplasmic reticulum (ER) and present them to cytotoxic T lymphocytes (CTLs). Endogenous proteins are degraded in the cytoplasm into peptides of 8 to 10 amino acids by a complex of subunits with multiple proteolytic activities called the large multifunctional protease (LMP) or proteasome. Translocation of the peptides from the cytosol to the ER is accomplished via the transporter associated with antigen processing (TAP) (1, 2). TAP is a heterodimer of TAP1 and TAP2 with, each subunit containing transmembrane domains and an ATP-binding motif (3-6).

The TAP genes reside close to each other within the MHC class II region, separated only by the LMP 7 gene (3, 7, 8). The TAP genes are known to be polymorphic with several mutations identified in different populations. To date, 13 nucleotide sequence variants have been described in TAP1 coding sequences (9-16). Based on these genetic variants, 6 TAP1 alleles (TAP1\*0101, TAP1\*0102N, TAP1\*020101, TAP1\*020102, TAP1\* 0301 and TAP1\* 0401) have been recognized by the World Health Organisation Nomenclature Committee for Factors of the HLA System (17). There is clear evidence that this polymorphism can affect the functionality of the transporter and serve as marker for human diseases. For examples, TAP1 alleles have been associated with several autoimmune diseases. In Canadian and German populations, TAP1\*0301 is positively associated whereas TAP1\*0401 is negatively associated with Grave's disease (18). TAP1\*0301 appears to be protective against

Behcet's disease in Spaniards (19) but is associated with Reiter's syndrome in American Caucasians (20). Increased risk for type 1 diabetes mellitus is found in American Caucasians with a TAP1 genotype 0101/0301 (10) and in Germans with the TAP1\*0201 allele (18). TAP1\*0101 appears to confer risk for juvenile psoriasis in Germans (22). TAP1 polymorphisms have also been correlated with susceptibility to infectious diseases. A valine at TAP 1 codon 333 in combination with HLA-A3 (23) or with several HLA Class II alleles has been associated with rapid HIV disease progression (24). Also, a single point mutation in the TAP1 gene (G deletion at codon 200), TAP 1\* 0102N, results in a significant loss of normal MHC class I expression and has been associated with the so-called bare lymphocyte syndrome characterized by recurrent respiratory infections (14). Recently, a novel mutation near the ATP-binding site of TAP1 was discovered in a human small cell lung cancer cell line (15). This mutation introduces an amino acid substitution (Arg→Gln) at codon 659 of TAP1 (designated as R659Q), resulting in a nonfunctional TAP1 protein (15, 25, 26).

With the exception of a single study in Africans (27), all studies of TAP1 have been performed in Caucasians or Asians from industrialised countries. The allelic distribution of TAP genes in people living in developing countries may differ from those living in industrialised countries due to overdominant selection pressure exerted on specific alleles by prevalent pathogens in these geographic areas (28). Because of the essential role of the TAP1 molecule in antigen presentation to CTLs, the

implication of TAP alleles in human disease's states and the possible genetic variation at this locus among ethnically diverse populations, we underwent a study to analyse the full extent of TAP1 polymorphism in an indigenous Zimbabwean population. Accordingly, we now report the nucleotide sequence diversity of the TAP1 gene in the Shona people of Zimbabwe, selected to represent a homogenous ancestral group.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Sample composition***

Our sample consisted of stored DNA extracts from 193 unrelated Zimbabweans of the Shona ethnic group who had participated in previous studies in our laboratory (29,30). Single strand conformational polymorphism (SSCP) and DNA sequencing procedures were performed using 45 randomly selected samples.

### **Laboratory Methods**

Molecular genetic analyses were performed on genomic DNA, obtained from whole peripheral blood using a standard phenol-chloroform extraction procedure.

### ***DNA sequence analysis***

The eleven exons of TAP1 were first scanned for sequence variants using PCR-SSCP analysis in DNA extracts from the 45 Zimbabweans. For each exon, two DNA samples representing each SSCP variant conformers observed were sequenced to determine the nucleotide sequence differences. Thus exon 1 DNA was sequenced in 8 individuals, exons 2, 8, 9, 11 in 2 individuals, exons 3, 5, 7, 10 in 4 individuals, and exons 4, 6 in 6 individuals.

The primers for PCR amplification of exon specific fragments were designed from the wild-type TAP1 sequence (GenBank accession number X66401). The primers were designed to cover the entire exon, as well as sequences at the exon-intron boundaries that are important for mRNA splicing. Details regarding primer sequences, fragment sizes and annealing temperatures for amplifying TAP1 exons for



SSCP and DNA sequencing procedures are given in Table 1. Amplification reactions for the SSCP analysis contained 200ng of DNA, 0.25mM of each dNTP (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), 1 X PCR buffer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 1.5mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin-Elmer), 2.5 units of TAQ polymerase (Perkin-Elmer), 15pmole of primers, and 1μCi of α- <sup>32</sup>P dATP (Amershan, Il, USA) in a total volume of 15μl. PCR cycling conditions included 5 minutes initial denaturation step at 95°C followed by 30 cycles of: 35 seconds at 95°C, 35 sec at appropriate annealing temperature, 35 seconds at 72 °C and final extension step at 72°C for 5 minutes. Amplified products were then subjected to two SSCP protocols for electrophoresis; MDE hydrolink gels (BMA, Rockland, ME, USA) at 6-8 W for 17 hours at room temperature and 6% polyacrylamide (National Diagnostics, Atlanta, USA) gels without glycerol at 25 W for 6 hours at 4°C.

The primers used for DNA sequence analysis were the same as those used for the SSCP (Table 1). The amplification and PCR cycling conditions were similar to those used for SSCP analysis except that α- <sup>32</sup>P dATP was excluded. The nucleotide sequences of the PCR products were determined by direct sequencing using BigDye terminator cycle sequencing reactions (Perkin Elmer). The reaction products were run in an automated DNA sequencing ABI PRISM 3100 capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All PCR products were sequenced in both directions.

### **TAP1 genotyping**

The variants at codons 333, 637 and 648 were detected by amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR using primers and PCR conditions as previously described (31). The polymorphism at codons 370 and 419 were typed by amplified-restriction fragment length polymorphism (A-RFLP) and modified A-RFLP, respectively. The primer sequences, annealing temperatures and restriction-endonuclease enzymes for the A-RFLP analyses are indicated in Table 2. Genomic DNA was amplified with the specific primers (Table 2) using the PCR conditions as described above. Amplified DNA products were then digested with the specific restriction enzymes according to the manufacturers instructions (Table 2). The digestion products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis and detected by staining with ethidium bromide. For the polymorphism at codon 370, the wild-type (normal) sequence shows 152- and 217-bp bands; the C→T substitution eliminates a cutting site, resulting in a 369-bp band. The wild-type sequence at codon 419 shows 26- and 111-bp bands; the G →T substitution eliminates a cutting site, resulting in a 137-bp band.

### **Statistical analysis**

Alleles frequencies were compared between groups by the Chi-square test.

## RESULTS

No variant conformers were observed after SSCP analysis of DNA fragments from exons 2, 8, 9 and 11. Four SSCP patterns were observed in exon 1, three patterns were observed in exons 4 and 6, and two SSCP variant conformers were observed in exons 3, 5, 10 and 7. DNA sequence analysis of two samples with each of the SSCP banding patterns revealed the presence of three synonymous and eight nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exons 1 (codons 7, 17, 141), 3 (codon 254), 4 (codon 333), 5 (codon 370), 6 (codons 419, 458), 7 (codon 487), and 10 (codons 637, 648) (Table 3). In the current study, all sequences were compared with the wild-type TAP1 sequence (GenBank accession number X66401), and the positions we report are in reference to this sequence. We identified five novel variants in the coding regions of TAP1. The nucleotide substitutions at codons 7 (C→T), 17 (G→C), and 419 (G→T) are nonsynonymous substitutions predicted to modify the amino acid composition of the protein. The two other novel mutations at codons 141 (T→C) and 487 (C→T) are synonymous substitutions (silent mutations).

TAP1 alleles are defined on the basis of nucleotide sequence variations that lead to amino acid substitutions located in the putative peptide binding or ATP binding domains of the protein (17). Consequently, allelic designations are based on the variants at codons 333, 637, and 648. We have determined the allelic frequencies of these polymorphisms along with two other nonsynonymous mutations located at codons 370 and 419 in the peptide binding domain of the TAP1 molecule. The allelic frequencies of TAP1 SNPs and TAP1 alleles in 193 Zimbabweans are shown in Tables 4 and 5, respectively. The TAP1\*0101 allele was the predominant allele in our population with a frequency of 66.3% followed by

the TAP1\*0401 (27.2%). In fact, the frequency of TAP1\*0401 in Zimbabweans is similar to that reported in other African populations (27) but is much higher than those reported in Caucasians (Americans and Europeans) and Asians (22, 27, 32, 33). Inversely, the TAP1\*0201 allele is found less frequently in Africans than in Caucasians and Asians.

## DISCUSSION

Our investigation of the entire coding region of TAP1 in 45 Zimbabwean subjects of African origin, revealed the presence of 11 nucleotide sequence variants, including five novel mutations, most of which are nonsynonymous substitutions. Three of the novel polymorphisms are located in exon 1 that encodes the N-terminal TAP-specific module that is responsible for the stability of the protein (34). Two of these exon 1 sequence variants are non-conservative substitutions with respect to amino acid composition and polarity; codon 7 (non-polar residue Pro to uncharged polar residue Ser) and codon 17 (non-polar residue Gly to charged polar residue Arg). TAP-mediated peptide translocation requires two steps: ATP-independent peptide binding to the cytosolic part of TAP and ATP-dependent transport into the ER (4, 35, 36). A cross-linking studies using photoreactive peptides have delineated TAP1 sequences encompassing residues 362-487 that were shown to be involved in the binding of peptides to the transporter (2). Deletion of some of the potential peptide-binding sites between residues 366 and 405 of TAP1 resulted in defective peptide transport (37). In the Zimbabwean DNA samples, we identified four nucleotide sequence variants (including two novel mutations at codons 419 and 487) in the putative TAP1 peptide-binding domain. Three of these mutations would be predicted to result in amino acid substitutions at the protein level; codon 370 (non-polar residue Ala to non-polar residue Val), codon 419 (non-polar residue Gly to charged polar residue Cys) and codon 458 (non-polar residue Val to non-polar residue Leu). Peptide translocation requires binding and hydrolysis of ATP by the nucleotide-binding domains (NBDs) of TAP1 and TAP2 (38). TAP1 binds ATP much more efficiently than does TAP2 (39). It is known that both NBDs are essential for TAP function, since mutations in one NBD lead to loss of transport action (15, 25, 26, 40, 41). Two polymorphisms in the putative TAP1 ATP-binding domain ) were found in Zimbabweans; codon 637 (charged polar residue Asp to non-polar residue Gly) and codon 648 (charged polar residue Arg to uncharged polar residue Gln. The polymorphisms at codons 637 and 648 have already been observed in previous studies and are shared by other ethnic groups (9, 10, 13, 18, 20, 22, 27, 31-33, 42). To date, the R659Q mutation in TAP1 found in human lung cancer cells is the only

naturally occurring mutation associated with a TAP defective transport function (15, 25, 26). This mutation was not seen in our African population or in any other population for that matter. Further investigations are needed to determine the net impact of the mutations described on the stability, peptide-binding and transport function of TAP protein. There are other known mutations in TAP1 that were not found in our survey of Zimbabwean DNA samples. SNPs at codons 518, 661 have been observed in Caucasians (11, 27). The silent mutation at codon 661 (Pro→Pro) defined the TAP1\*020102 allele (17). Four additional sites (codons 512, 540, 541, and 609) have been observed in a single study of African American patients with Graves' disease (16).

The distribution of TAP alleles in people living in developing countries may differ from that seen in people living in industrialised countries due to selection pressures exerted by holoendemic pathogens in these geographic areas (28). The Shona people of Zimbabwe represent a relatively homogeneous African ancestral group. Based on TAP1 nucleotide sequence variations at codons 333, 637, and 648 we observed the presence of four alleles in this indigenous African population (Table 5). Our data further confirm that there are significant inter-ethnic differences in the distribution of TAP1 alleles. The frequency of TAP1\*0401 in Zimbabweans (27.2%) is similar to that reported in other African populations (23.8%) but is much higher than those reported in Caucasians and Asians (3.1%,  $p < 0.001$ ) (22, 27, 32, 33). This allele has been associated with protection from Grave's disease (18). Interestingly, among indigenous Zimbabweans, Grave's disease is very rare (Personal Communication, Zimbabwe Ministry of Health). Inversely, the TAP1\*0201 allele is found less frequently in Africans (3.3%) than in Caucasians (9.9%,  $p < 0.001$ ) and Asians (14.7%,  $p < 0.001$ ). Although the TAP1\*0201 allele has been associated with the development of type 1 diabetes mellitus, the association disappeared when patients and controls were matched for other HLA predisposing alleles (18). Finally, the allele frequency of the codon 333 Val, associated with rapid HIV disease progression (24, 23), is significantly higher in African populations (30%) than in Caucasians

(18%,  $p < 0.001$ ) and Asians (14.7%,  $p < 0.001$ ). This observation is very interesting considering the high prevalence of HIV in Africa.

In summary, we have conducted a thorough analysis of the nucleotide sequence of TAP1 gene in an indigenous Zimbabwean population. We have identified several novel and non-conservative substitutions with respect to predicted amino acid composition and polarity in critical domains of the protein that could modulate its function. The data from this study and others (22, 27, 32, 33) demonstrate that the allelic distribution of TAP1 gene differs widely in populations from industrialised and developing countries, presumably due to geographically-determined selection pressures. Further studies are needed to elucidate the net impact of TAP1 polymorphisms on the protein's function and its role in the pathogenesis of specific human conditions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

M. Roger is supported by career award from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). The ZVITAMBO project is supported by the Canadian International Development Agency (R/C Project 690/M3688), Cooperative Agreement DAN 0045-A-005094-00 between the U.S. Agency for International Development and The Johns Hopkins School of Hygiene and Public Health, and the Rockefeller Foundation. It is a collaborative project of The University of Zimbabwe, The Harare City Health Department, The Johns Hopkins School of Hygiene and Public Health, and the Montreal General Hospital Research Institute, McGill University



## REFERENCES

- 1-Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I—restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998 : **16**:323-58.
  
- 2-Nijenhuis M, Schmitt S, Armandola EA, Obst R, Brunner J, Hammerling GJ. Identification of a contact region for peptide on the TAP1 chain of the transporter associated with antigen processing. *J Immunol* 1996: **156**:2186-95.
  
- 3-Spies T, Bresnahan M, Barham S et al. A gene in the human major histocompatibility complex classe II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 1990: **348**:744-7.
  
- 4-Androlewicz MJ, Anderson KS, Cresswell P. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependant manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993: **90**:9130-4.
  
- 5-Bahram S, Arnold D, Bresnahan M, Strominger JL, Spies T. Two putative subunits of a peptide pump encoded in the human major histocompatibility complex class II region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991: **88**:10094-8.
  
- 6-Momburg F, Hammerling GJ. Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv Immunol* 1998: **68**: 191-256.

7-Beck S, Kelly A, Radley E, Khushid F, Alderton RP, Trowsdale J. DNA sequence analysis of 66 kb of the human MHC class II region encoding a cluster of genes for antigen processing. *J Mol Biol* 1992; **228**:433-41.

8-Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 1990; **348**:741-4.

9-Colonna M, Bresnahan M, Bahram S, Strominger JL, Spies T. Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**:3932-36.

10-Jackson DG, Capra JD. TAP1 alleles in insulin-dependent diabetes mellitus: a newly defined centromeric boundary of disease susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**:11079-83.

11-Aoki Y, Isselbacher KJ, Pillai S. Polymorphisms involving the transmembrane domains of human TAP2. *Immunogenetics* 1993; **38**:382.

12-Yan G, Shi L, Fu Y et al. Screening of the TAP1 gene by denaturing gradient gel electrophoresis in insulin-dependent diabetes mellitus: detection and comparison of new polymorphisms between patients and controls. *Tissue Antigens* 1997; **50**: 576-85.

13-Furukawa H, Murata S, Yabe T et al. Splice acceptor site mutation of the transporter associated with antigen processing-1 gene in human bare lymphocyte syndrome. *J Clin Invest* 1999; **103**:755-58.

14-Chen HL, Gabrilovich D, Tampe R, Girgis KR, Nadaf S, Carbone DP. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet* 1996; **13**:210-3.

15-Ofosu MH, Brown C, Cheatham W, Henry L, Austin C. TAP1 polymorphism identified in African-American Graves' disease patients. *Immunol Invest* 1998; **27**:281-9.

16-Marsh SGE, Bodmer JG, Albert ED et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Tissue Antigens* 2001; **57**:236-83.

17-Rau H, Nicolay A, Usadel Kh et al. Polymorphisms of TAP1 and TAP2 genes in Graves' disease. *Tissue Antigens* 1997; **49**:16-22.

18-Gonzalez-Escibano MF, Morales J, Garcia-Lozano JR et al. TAP polymorphism in patients with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 1995; **54**: 386-8.

- 19-Barron KS, Reveille JD, Carrington M, Mann DL, Robinson MA. Susceptibility to Reiter's syndrome is associated with alleles of TAP genes. *Arthritis Rheum* 1995; **38**:684-9.
- 20-Rau H, Nicolay A, Donner H, Usadel KH, Badenhoop K. Polymorphisms of TAP1 and TAP2 genes in German patients with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Immunogenet* 1997; **24**:229-36.
- 21-Höhler T, Weinmann A, Schneider PM et al. TAP-polymorphisms in juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. *Hum Immunol* 1996; **51**:49-54.
- 22-Keet IPM, Tang J, Klein M et al. Consistent associations between HLA and time to AIDS in three prospective seroconverters cohorts. *The 4<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections* 1997: 208.
- 23-Kaslow RA, Carrington M, Apple R et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 1996; **2**: 405-11.
- 24-Gaudet R, Wiley DC. Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBI J* 2001; **20**:4964-72.

- 25-Saveanu L, Daniel S, van Endert PM. Distinct functions of the ATP binding cassettes of transporters associated with antigen processing: a mutational analysis of Walker A and B sequences. *J Biol Chem* 2001; **276**:22107-13.
- 26-Tang J, Freedman DO, Allen S et al. TAP1 polymorphisms in several human ethnic groups: characteristics, evolution, and genotyping strategies. *Hum Immunol* 2001; **62**:256-68.
- 27-Parham P, Ohta T. Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 1996; **272**:67-74.
- 28-Matte C, Lacaille J, Zijenah L, Ward B, the Zvitambo Study Group, Roger M. HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. *Hum Immunol* 2000; **61**:1150-6.
- 29-Matte C, Lacaille J, Zijenah L, Ward B, the Zvitambo Study Group, Roger M. HLA-G exhibits low level of polymorphism in indigenous East Africans. *Hum Immunol* 2002; **63**:495-501.
- 30-Powis SH, Tonks S, Mockridge I, Kelly AP, Bodmer JG, Trowsdale J. Alleles and haplotypes of the MHC-encoded ABC transporters TAP1 and TAP2. *Immunogenetics* 1993; **37**:373-80.

- 31-Moins-Teisserenc H, Semana G, Alizadeh M et al. TAP2 Gene Polymorphism contributes to genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Hum Immunol* 1995; **42**:195-202.
- 32-Takeuchi F, Nakano K, Matsuta K et al. Polymorphism of TAP1 and TAP2 in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; **49**:280-2.
- 33-Elliot T. Transporter associated with antigen processing. *Advances Immunol* 1997; **65**:47-109.
- 34-Van Endert PM, Tampe R, Meyer TH, Tisch R, Bach JF, McDevitt HO. A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* 1994; **1**: 491-500.
- 35-Müller K, Ebensberger C, Tampé R. Nucleotide binding to the hydrophobic C-terminal domain of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem* 1994; **269**:14032-7.
- 36-Ritz U, Momburg F, Pircher HP, Strand D, Huber C, Sliger B. Identification of sequences in the human peptide transporter subunit TAP1 required for transporter associated with antigen processing (TAP) function. *Int Immunol* 2001; **13**:31-41.
- 37-Lankat-Buttgereit B, Tampe R. The transporter associated with antigen processing : function and implications in human diseases. *Physiol Rev* 2002; **82**:187-204.

38-Alberts P, Daimke O, Deverson EV, Howard JC, Knittler MR. Distinct functional properties of the TAP subunits coordinate the nucleotide-dependent transport cycle. *Curr Biol* 2001; **11**: 242-51.

39-Lapinski PE, Neubig RR, Raghavan M, Walker A lysine mutations of TAP1 and TAP2 interfere with peptide translocation but not peptide binding. *J Biol Chem* 2001; **276**:7526-33.

40-Knittler MR, Alberts P, Deverson EV, Howard JC. Nucleotide binding by TAP mediates association with peptide and release of assembled MHC class I molecules. *Curr Biol* 1999; **9**:999-1008.

41-Kuwata S, Yanagisawa M, Saeki H et al. Lack of primary association between transporter associated with antigen processing genes and atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995; **96**:1051-60.

42-Powis SH, Rosenberg WM, Hall M et al. TAP1 and TAP2 polymorphism in celiac disease. *Immunogenetics* 1993; **38**:345-50.

TABLE 1: Primer sequences and annealing temperatures for amplifying TAP1 exons for SSCP and DNA sequencing analyses

Exon	Primer Fragment size name	Primer sequence	Annealing temperature	(bp)
Exon 1a	Tap1SCP1a Tap1ACP1a	CGT CCG AGT GCC AAT GGC TA AAG CCC AGT GCC GCA GCT AA	62°C	327
Exon 1b	Tap1SCP1b Tap1ACP1b	GCT GGC TGG CTG CTT TGA A CCT GCG TTC CCC TTA CCA A	50°C	343
Exon 2	Tap1SCP2 Tap1ACP2	TGA TGC CCT CCA GGA TAA TG CCA ACT CCC TCA TTT GCA GG	58°C	271
Exon 3	Tap1SCP3 Tap1ACP3	CTG CTG TCC GAA ATG CAC TTA GGA TAT GAA CAG TAC ATG GCG T	52°C	273
Exon 4	Tap1SCP4 Tap1ACP4	ACT CTC TTC TCC CCA ACC GGA GAT GAG GGT CTG TGT AG	56°C	274
Exon 5	Tap1S5 Tap1A5	CCT CTG TCT CTT CTC ACC TT ATA GGA ATG GGA ATG GAG TC	57°C	369
Exon 6	Tap1SCP6 Tap1ACP6	TGT GTC CCC TCC AGA TTT CT AGC AAG AAG GGT AAA GAA TGG	52°C	277
Exon 7	Tap1SCP7 Tap1ACP7	CAC ATA ATG CTG GCA AGC A GTG GAA TAC AGG GAG TGG TA	56°C	272
Exon 8	Tap1SCP8 Tap1ACP8	TTG GTA GCC TCT TAT CGT GT CTC TTC GTA TTT GAT GCT CC	54°C	262
Exon 9	Tap1SCP9 Tap1ACP9	TAA CCA TAC TCC CAT GTG CC CTA CTG GGG TTT CAG CAA AG	58°C	276
Exon 10	Tap1SCP10 Tap1ACP10	CTG TGT GCA TGT ACA TGC GT GAA GCA AGA TTG GGT GGG AT	57°C	252
Exon 11	Tap1SCP11 Tap1ACP11	GAC GGT CCG ATG TCT TTC C AAA GGG AGG GAG ATG GAG TG	55°C	269



**TABLE 2:** Primer sequences, annealing temperatures and restriction-endonuclease enzymes for A-RFLP typing of TAP1

Polymorphic site	Primer name	Primer sequence	Annealing temperature	Restriction enzyme
Codon 370	Tap1S5	CCT CTG TCT CTT CTC ACC TT	57°C	<i>Bgl</i> I (NEB)
	Tap1A5	ATA GGA ATG GGA ATG GAG TC		
Codon 419	TAP1SRF6	TTT GTG GTC TCT TTA TAG ATT <u>CCA</u>	56°C	<i>Mav</i> I (Fermentas)
	TAP1ARF6	TGG GTG AAC TGC ATC TGG TAG		

In the oligonucleotide sequence TAP1SRF6, nucleotide underlined represent a mismatch.

**TABLE 3:** TAP1 nucleotide sequence variations observed in Zimbabweans

Location	Nucleotide substitution	Genomic position	Amino acid change	Reference
Codon 7	CCC- <b>TCC</b>	25 042	PRO → SER	New
Codon 17	GGA- <b>CGA</b>	25 072	GLY → ARG	New
Codon 141	GTT-GTC	25 446	None (VAL)	New
Intron 2	T- <b>C</b>	26 394		New
Codon 254	GGC- <b>GGT</b>	26 469	None (GLY)	11
Codon 333	ATC- <b>GTC</b>	27 663	ILE → VAL	(9)
Codon 370	GCT- <b>GTT</b>	28 201	ALA → VAL	(12)
Codon 419	GGT- <b>TGT</b>	29 548	GLY → CYS	New
Codon 458	GTG- <b>TTG</b>	29 665	VAL → LEU	(10)
Intron 6	G- <b>T</b>	29 737		New
Codon 487	CGC- <b>CGT</b>	29 903	None (ARG)	New
Intron 9	C- <b>T</b>	31 412		New
Codon 637	GAC- <b>GGC</b>	31 462	ASP → GLY	(9)
Codon 648	CGA- <b>CCA</b>	31 495	ARG → GLN	(10)
Intron 10	C- <b>A</b>	31 617		New

Variant nucleotides are in bold.

**TABLE 4:** Allelic frequencies of TAP1 single nucleotide polymorphisms observed in 193 Zimbabweans.

	I333V	A370V	G419C	D637G	R648Q
WT	66.3%	97.7%	89.6%	68.7%	72.8%
M	33.7%	2.3%	10.4%	31.3%	27.2%

WT: wild-type

M:mutant

**TABLE 5:** TAP1 allele frequencies (%) in different populations

	AFRICANS				CAUCASIANS				ASIANS	
	Zimbabwean		Zambian		Americans		Europeans			
	(n=386)	(n=628)	(n=570)	(n=992)	(n=154)	(n=82)	(n=202)	(n=190)		
TAP1*0101	66.3	66.7	72.1	80.8	75.3	85.4	73.8	85.3		
TAP1*0201	4.2	2.8	3.3	8.2	13.6	9.7	15.8	14.7		
TAP1*0301	2.3	2.1	2.1	4.1	3.3	3.7	8.9	0		
TAP1*0401	27.2	25.4	22.1	3.7	5.8	1.2	1.5	0		
References	(27)	(27)	(27)	(27)	(27)	(32)	(22)	(33)		

n= number of alleles

## **ACCORD DES COAUTEURS**

### **1. Identification de l'étudiant et du programme**

LAJOIE Julie

2-500-1-0 M.SC. Microbiologie et immunologie

### **2. Description de l'article**

#### Auteurs de l'article

Julie Lajoie, Lynn Zijenah, Marie-Claude Faucher, Brian Ward, Michel Roger

#### Titre de l'article

Transporter associated with antigen protein (TAP)-2 polymorphism in the Shona people of Zimbabwe

#### Revue qui publie l'article et date de publication

Article soumis

### **3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Julie Lajoie inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Étude du polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 en relation avec la susceptibilité à l'infection par le VIH dans une population Africaine.

Brian Ward  
Nom (caractère d'imprimerie)

  
Signature

03/02/11  
Date

# ACCORD DES COAUTEURS

## 1. Identification de l'étudiant et du programme

LAJOIE Julie

2-500-1-0 M.SC. Microbiologie et immunologie

## 2. Description de l'article

Auteurs de l'article

Julie Lajoie, Lynn Zijenah, Marie-Claude Faucher, Brian Ward, Michel Roger

Titre de l'article

New transporter associated with antigen protein (TAP)-2 polymorphisms in the Shona people of Zimbabwe

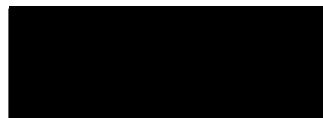
Revue qui publie l'article et date de publication

Article soumis

## 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Julie Lajoie inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Étude du polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 en relation avec la susceptibilité à l'infection par le VIH dans une population Africaine.

Michel Roger  
Nom (caractère d'imprimerie)



Signature

5 fév 2003  
Date

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

LAJOIE Julie

2-500-1-0 M.SC. Microbiologie et immunologie

### 2. Description de l'article

#### Auteurs de l'article

Julie Lajoie, Lynn Zijenah, Marie-Claude Faucher, Brian Ward, Michel Roger

#### Titre de l'article

New transporter associated with antigen protein (TAP)-2 polymorphisms in the Shona people of Zimbabwe

#### Revue qui publie l'article et date de publication

Article soumis

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Julie Lajoie inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Étude du polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 en relation avec la susceptibilité à l'infection par le VIH dans une population Africaine.

Marie-Claude Faucher

Nom (caractère d'imprimerie)

  
Signature

5 Feb 2003

Date

**DEPARTMENT OF  
IMMUNOLOGY**

P.O. Box A 178  
Avondale  
HARARE, Zimbabwe

Telephone: 263-4-791631  
Telex: 26580 UNIVZ  
Telegrams: UNIVERSITY  
Fax: 263-4-724912  
E-mail: immunolo@internet.co.zw



FACULTY OF MEDICINE

UNIVERSITY OF ZIMBABWE

**ACCORD DES COAUTEURS****1. Identification de l'étudiant et du programme**

LAJOIE Julie

2-500-1-0 M.SC Microbiologie et Immunologie

**2. Description de l'article**Auteurs de l'article

Julie Lajoie, Lynn S. Zijenah, Marie-Claude Faucher, Brian Ward, Michel Roger

Titre de l'article

Transporter associated with antigen protein (TAP)-2 polymorphism in the Shona people of Zimbabwe

Revue qui publie l'article et date de publication

Article soumis

**3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant**

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Julie Lajoie inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre: Étude du polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 en relation avec la susceptibilité à l'infection par le VIH dans une population Africaine.

Lynn S. Zijenah

\_\_\_\_\_  
Nom (caractère d'imprimerie)\_\_\_\_\_  
Signature

3 February 2003

\_\_\_\_\_  
Date



## **New transporter associated with antigen processing (TAP)-2 polymorphisms in the Shona people of Zimbabwe**

Julie Lajoie<sup>1,2</sup>, Lynn S. Zijenah<sup>3</sup>, Marie-Claude Faucher<sup>1</sup>, Brian J. Ward<sup>4</sup>, The ZVITAMBO study group<sup>5</sup> and Michel Roger<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'immunogénétique, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

<sup>2</sup>Département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal

<sup>3</sup>*Department of immunology, University of Zimbabwe*

<sup>4</sup>Research Institute of the McGill University Hospital Complex

<sup>5</sup>The ZVITAMBO Study Group are H Chidawanyika, P Iliff, A Mahomva, F Majo, L Malaba, M Mbizvo, L Moulton, K Mutasa, J Mutsambi, M Ndhlovu, L Propper, A Ruff, N Tavengwa, C Zunguza, P Zvandasara and Co-Principal Investigators: K Nathoo and J Humphrey.

Abbreviated title: TAP2 DNA sequence analysis in Zimbabweans

Keywords: African, antigen presentation, TAP2, MHC, polymorphism

\*Address correspondence to:

Michel Roger M.D, Ph.D

Département de microbiologie, Hôpital Notre-Dame du CHUM,

1560 Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1.

Phone: (514) 890-8000 (2-5802), Fax: (514) 412-7512

E-mail address: [REDACTED]

Abbreviations: A-RFLP, amplified-restriction fragment length polymorphism; ARMS; amplification refractory mutation system; bp, base pairs; CTL, cytotoxic lymphocytes T; ER; endoplasmic reticulum; HCV, hepatitis C virus; HIV, human immunodeficiency virus; HLA, human leukocyte antigen; LMP, large multifunctional protease; MHC, major histocompatibility complex; NBD, nucleotide-binding domain; PCR, polymerase chain reaction; SNP, single nucleotide polymorphism; SSCP, single strand conformational polymorphism; TAP, transporter associated with antigen processing; WHO, World Health Organisation;

## ABSTRACT

Most studies to date, on transporter associated with antigen processing (TAP)-2 polymorphism have been conducted in Caucasians or Asians from industrialised countries. Because of the essential role of this molecule in antigen processing, the implication that polymorphism could be a major factor in human disease and the possible genetic variation at this locus among ethnically diverse populations, we undertook a study to analyse the full extent of TAP2 polymorphism in an indigenous Zimbabwean population (Shona ethnic group). Using single stranded conformation polymorphism and DNA direct sequencing procedures, we detected the presence of 17 nucleotide sequence variations in the entire coding region of TAP2. Of these variants, eleven are non-conservative substitutions with respect to amino acid composition and are located in a region of the protein that could modulate its function. Six new polymorphic sites were identified in exon 1 (codons 15 Val→Ala, 53 Leu→Val), exon 3 (codon 220 Arg→Arg), exon 4 (codons 257 Thr→Ile, 313 Arg→His), and exon10 (codon 609 Ala→Val). Significant differences were seen in the distribution of the known 374Thr, 565Thr and 651Cys variants between African and non-African populations. These differences most likely reflect evolutionary pressures generated by environmental factors such as prevalent pathogens in these geographically distinct regions. Further studies are needed to elucidate the net impact of TAP2 polymorphism on the protein's function and it's role in disease pathogenesis.

## INTRODUCTION

Major histocompatibility complex (MHC) class I molecules bind peptides in the endoplasmic reticulum (ER) and present them to cytotoxic lymphocytes T (CTLs). Endogenous proteins are degraded in the cytoplasm into peptides of 8 to 10 amino acids by a complex of subunits with multiple proteolytic activity called the large multifunctional protease (LMP) or proteasome. The translocation of the peptides from the cytosol to the ER is mediated by the transporter associated with antigen processing (TAP) [1,2]. TAP is an heterodimer of TAP1 and TAP2, each subunit containing transmembrane domains and an ATP-binding motif [3-6].

The TAP genes reside close to each other within the MHC class II region, separated by the LMP 7 gene [3,7,8]. The TAP genes are polymorphic with several mutations identified in different populations. To date, 19 nucleotide sequence variants have been described in TAP2 coding sequences [5,9-16]. Based on these genetic variants, 4 TAP2 alleles (TAP2\*0101, TAP2\*0102, TAP2\*0103, and TAP2\*0201) have been recognized by the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System [17]. Two additional non-official alleles defined by a Val→Ile substitution at codon 379, TAP2\*C and TAP2\*D have been described according to the reports of Powis and colleagues [18,19]. There is clear evidence that TAP2 polymorphism can affect the functionality of the transporter and serve as markers for human diseases. Defects in TAP2 protein have been reported in two families with HLA class I deficiency, the so-called bare lymphocyte syndrome type I [11,20]. TAP2 alleles have also been associated with several autoimmune diseases. For example, TAP2\*0101 is positively

associated with Grave's disease in Canadian and German populations [21], Reiter's syndrome in American Caucasians [22], and Bechet's disease in Japanese [23]. TAP2\*0201 is protective against Behcet's disease in Japanese [23]. TAP2\*0103 appears to confer risk for type 1 diabetes mellitus in the Finns [24] and American Caucasians [25]. TAP2 polymorphism has also been correlated with susceptibility to infectious diseases. In Northern Indian Hindus, TAP2\*0101/0103 and TAP\*0201 are positively associated with pulmonary tuberculosis and tuberculoid leprosy, respectively [26]. Recent studies have shown that TAP2\*0103 contributes to slow hepatitis C virus (HCV) disease progression and that the frequency of TAP2\*0102 allele in HCV-infected patients is significantly lower than that of HCV-uninfected individuals [27, 28]. Several reports have found consistent associations between combinations of HLA and TAP 2 alleles and the rate of HIV disease progression [29-31].

To date most studies on TAP 2 polymorphism have been performed in Caucasians or Asians from industrialised countries. The allelic distribution of TAP genes in people living in developing countries may differ from those living in industrialised countries due to overdominant selection pressure exerted on specific alleles by prevalent pathogens in these geographic areas [32]. Because of the essential role of the TAP2 molecule in antigen presentation to CTLs, the implication of TAP alleles in human disease states and the possible genetic variation at this locus among ethnically diverse populations, we undertook a study to analyse the full extent of TAP2 polymorphism in an indigenous Shona population in Zimbabwe.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Sample composition***

Our sample consisted of stored DNA extracts from 192 unrelated Zimbabweans of the Shona ethnic group who had participated in previous studies in our laboratory [33,34]. Single strand conformational polymorphism (SSCP) and DNA sequencing procedures were performed using 45 randomly selected samples.

### **Laboratory Methods**

Molecular genetic analyses were performed on genomic DNA, obtained from whole peripheral blood using a standard phenol-chloroform extraction procedure.

### ***DNA sequence analysis***

The eleven exons of TAP2 were first scanned for sequence variants using PCR-SSCP analysis in DNA extracts from the 45 Zimbabweans. For each exon, two DNA samples representing each SSCP variant conformers observed were sequenced to determine the nucleotide sequence differences. Thus, DNA from exons 1, 2, 3, and 7 was sequenced in 4 individuals, exons 4, 10, and 11 in 6 individuals, exons 5, 6, and 9 in 8 individuals and, exon 8 in 2 individuals.

The primers for PCR amplification of exon specific fragments were designed from the wild-type TAP2 sequence (GenBank accession number X66401). The primers were designed to cover the entire exon, as well as sequences at the exon-intron

boundaries that are important for mRNA splicing. Details regarding primer sequences, annealing temperatures and fragment sizes for amplifying TAP2 exons for SSCP and DNA sequencing procedures are given in Table 1. Amplification reactions for the SSCP analysis contained 200ng of DNA, 0.25mM of each dNTP (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), 1 X PCR buffer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), 1.5mM  $MgCl_2$  (Perkin-Elmer), 2.5 units of TAQ polymerase (Perkin-Elmer), 15pmole of primers, and 1 $\mu$ Ci of  $\alpha$ -  $^{32}P$  dATP (Amershan, Il, USA) in a total volume of 15 $\mu$ l. PCR cycling conditions included 5 minutes initial denaturation step at 95°C followed by 30 cycles of: 35 seconds at 95°C, 35 seconds at an appropriate annealing temperature, 35 seconds at 72 °C and a final extension step at 72°C for 5 minutes. Amplified products were then subjected to two SSCP protocols for electrophoresis; MDE hydrolink gels (BMA, Rockland, ME, USA) at 6-8 W for 17 hours at room temperature and 6% polyacrylamide (National Diagnostics, Atlanta, USA) gels without glycerol at 25 W for 6 hours at 4°C.

The primers used for DNA sequence analysis were the same as those used for the SSCP (Table 1). The amplification and PCR cycling conditions were similar to those used for SSCP analysis except that  $\alpha$ -  $^{32}P$  dATP was excluded. The nucleotide sequences of the PCR products were determined by direct sequencing using BigDye terminator cycle sequencing reactions (Perkin Elmer). The reaction products were run in an automated DNA sequencing ABI PRISM 3100 capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All PCR products were sequenced in both directions.

### **TAP2 genotyping**

The variants at codons 379, 565, and 665 were detected by amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR using primers and PCR conditions as previously described [18]. The polymorphism at codons 257, 313, 374, and 609 were typed by amplified-restriction fragment length polymorphism (A-RFLP). The primer sequences, annealing temperatures and restriction-endonuclease enzymes for the A-RFLP analyses are indicated in Table 2. Genomic DNA was amplified with the specific primers (Table 2) using the PCR conditions described above. Amplified DNA products were then digested with the specific restriction enzymes according to the manufacturer instructions (Table 2). The digestion products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis and detected by staining with ethidium bromide. For the polymorphism at codon 257, the wild-type (normal) sequence shows a 316 bp band; the C→T substitution introduces a cutting site, resulting in 78- and 238-bp bands. The wild type sequence at codon 313 shows 25- and 78-bp bands; the G→A substitution eliminates a cutting site, resulting in a 103 bp band. The wild type sequence at codon 374 shows 65- and 261-bp bands; the G→A substitution eliminates a cutting site, resulting in a 326 bp band. Finally, the wild-type sequence at codon 609 shows 20- and 107-bp bands; the C→ T substitution eliminates a cutting site, resulting in a 127 bp band.

### **Statistical analysis**

Allele frequencies in our study population were compared with published frequencies in other populations by the Chi-square test.



## RESULTS

No variant conformers were observed after SSCP analysis of DNA fragments from exon 8. Two SSCP patterns were observed in exons 1, 2, 3, 7, three patterns were observed in exons 4, 10, 11 and four SSCP variant conformers were observed in exons 5, 6 and 9. DNA sequence analysis of two samples with each of the SSCP banding patterns revealed the presence of six synonymous and eleven nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exons 1 (codons 15, 53), 3 (codon 220), 4 (codons 257, 313), 5 (codons 374, 379), 6 (codon 386), 7 (codons 458, 466, 467), 9 (codon 565), 10 (codons 604, 609) and 11 (codons 665, 687, 697) (Table 3). In the current study, all sequences were compared with the wild-type TAP2 sequence (GenBank accession number X66401), and the positions we report are in reference to this sequence. We identified six novel variants in the coding regions of TAP2. The nucleotide substitutions at codons 15 (T→C), 53 (C→G), 257 (C→T), 313 (G→A) and 609 (C→T) are nonsynonymous substitutions predicted to modify the amino acid composition of the protein. The novel mutation at codon 220 (C→A) is a synonymous substitution (silent mutation).

The allelic frequencies of the nucleotide sequence variations that lead to amino acid substitutions located in the putative peptide binding (codons 257, 313, 374, 379) and ATP binding (codons 565, 609, 651, 665) domains of TAP2 molecule in Zimbabweans and in other populations are shown in Table 4. TAP2 alleles are defined on the basis of the variants at codons 379, 565, 651, and 665 [17]. The TAP2\*0101 allele was the predominant allele in our population with a frequency of 50.8% followed by TAP2\*0201

(20.6%), TAP2\*C (15.1%), TAP2\*0102 (9.4%), and TAP2\*D (4.1%). The TAP\*0103 allele was absent in the Zimbabwean population.

## DISCUSSION

Our investigation of the entire coding region of TAP2 in 45 Zimbabwean subjects of the Shona ethnic group, revealed the presence of 17 nucleotide sequence variants, including six novel mutations, most of which are nonsynonymous substitutions. Two of the novel polymorphisms are located in exon 1 that encodes the N-terminal TAP-specific module that is responsible for stability of the protein [35]. These exon 1 mutations would result in amino acid substitutions at the protein level; codon 15 (non-polar residue Val to non-polar residue Ala) and codon 53 (non-polar residue Leu to non-polar residue Val).

TAP-mediated peptide translocation requires two steps: ATP-independent peptide binding to the cytosolic part of TAP and ATP-dependent transport into the ER [4,36,37]. Functional analysis of chimeric rat TAP2 suggests that three independent clusters of polymorphic amino acids (TAP2 residues 217/218; 262, 265, 268; 374, 380) are involved in substrate specificity [38,39]. A Cross-linking study using photoreactive peptides has delineated human TAP2 sequences encompassing residues 301-433 that are involved in the binding of peptides to the transporter [40]. In the Zimbabwean DNA samples, we identified five nucleotide sequence variants (including two novel mutations at codons 257 and 313) in this putative TAP2 peptide-binding domain. Four of these mutations are non-conservative substitutions with respect to amino acid composition and polarity; codon 257 (uncharged polar residue Thr to non-polar residue Ile), codon 313 (charged polar residue Arg to charged polar residue His), codon 374 (non-polar residue Ala to uncharged polar residue Thr), and codon 379 (non-polar residue Val to non-polar residue Ile). The frequency of the SNP at codon 374 (374Thr) in Zimbabweans (9.1%) is similar to that reported in an other African population (~6.7%,  $p=0.18$ ) but is higher than those reported

in American Caucasians and Brazilians (0-2%,  $p < 0.001$ ) [41]. This observation is very interesting because a change of the non-polar amino acid 374 Ala to a polar amino acid 374 Asp is known to alter the specificity of peptide transport [42]. The 374Thr variant in Africans is also a polar amino acid.

Peptide translocation requires binding and hydrolysis of ATP by the nucleotide-binding domains (NBDs) of TAP1 and TAP2 [43]. It is known that both NBDs are essential for TAP function, since mutations in either one leads to loss of transport action [44-46]. Six polymorphisms (including one novel mutation at codon 609) in the putative TAP2 ATP-binding domain were found in Zimbabweans. Four of these mutations are nonsynonymous substitutions; codon 565 (non-polar residue Ala to uncharged polar residue Thr), codon 609 (non-polar residue Ala to non-polar residue Val), codon 665 (uncharged polar residue Thr to non-polar residue Ala), and codon 687 (Stop codon→Gln). Striking differences in the distribution of the 565Thr and the 651Cys variants are seen among different populations (Table 4). The 565Thr variant is relatively frequent in Zimbabweans and Zambians (~15.3%) but is almost absent in American Caucasians (0.7%,  $p < 0.001$ ). Conversely, the 651Cys variant is absent in Zimbabweans and Zambians but is found at a frequency of 5.3% in Americans Caucasians ( $p < 0.001$ ). The latter mutation defines the TAP2\*0103 allele [17] that is associated with an increased risk for type 1 diabetes mellitus in Caucasians [25,24] and with slow HCV disease progression in Japanese patients [28]. It is interesting to note that 565Thr and 651Cys variants in Rwandans do not follow the same distribution pattern as that reported in the other African populations studied. In fact, the reported allele frequencies of these mutations in Rwandans are more or less similar to those

observed in Caucasians. There are other known mutations in TAP2 that were not found in our survey of Zimbabwean DNA samples. SNPs at codons 253 (Arg→ stop) (18) and 326 (deletion A) [15] have been associated with HLA class I deficiency in Moroccan and Turkish families, respectively. One additional site at codon 577 (Met→Val) has been observed in Japanese subjects [16,47,48].

In summary, our investigation of the nucleotide sequence of TAP2 gene in an indigenous Shona population, has led to the identification of novel non-conservative substitutions with respect to amino acid composition and polarity in a critical regions of the protein that could modulate its function. Striking differences in the distribution of some of these mutations are observed across diverse ethnic populations probably due to overdominant selection pressure exerted on specific alleles by environmental factors such as prevalent pathogens in these geographically distinct areas. Further studies are needed to elucidate the net impact of TAP2 polymorphism on the function of this protein and its role in disease pathogenesis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

M. Roger is supported by career award from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). The ZVITAMBO project is supported by the Canadian International Development Agency (R/C Project 690/M3688), Cooperative Agreement DAN 0045-A-005094-00 between the U.S. Agency for International Development and The Johns Hopkins School of Hygiene and Public Health, and the Rockefeller Foundation. This work is a collaborative project of The University of Zimbabwe, The Harare City Health Department, The Johns Hopkins School of Hygiene and Public Health, and McGill University Hospital Complex Research Institute

## REFERENCES

- 1- Pamer E, Cresswell P: Mechanisms of MHC class I—restricted antigen processing. *Ann Rev Immunol* 16:323,1998.
- 2- Nijenhuis M, Schmitt S, Armandola EA, Obst R, Brunner J, Hammerling GJ: Identification of a contact region for peptide on the TAP1 chain of the transporter associated with antigen processing. *J Immunol* 156:2186, 1996.
- 3- Spies T, Bresnahan M, Bahram S, Arnold D, Blank G, Mellins E, Pious D, DeMars R: A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 348:744, 1990.
- 4- Androlewicz MJ, Anderson KS, Cresswell P: Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9130, 1993.
- 5-Bahram S, Arnold D, Bresnahan M, Strominger JL, Spies T: Two putative subunits of a peptide pump encoded in the human major histocompatibility complex class II region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10094, 1991.
- 6- Momburg F, Hammerling GJ: Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv Immunol* 68:191, 1998.
- 7- Beck S, Kelly A, Radley E, Khurshid F, Alderton RP, Trowsdale J: DNA sequence analysis of 66 kb of the human MHC class II region encoding a cluster of genes for antigen processing. *J Mol Biol* 228:433, 1992.
- 8- Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A: Sequences encoded in class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 348:741, 1990.
- 9- Colonna M, Bresnahan M, Bahram S, Strominger JL, Spies T: Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3932, 1992.

- 10- Powis SH, Mockridge I, Kelly A, Kerr LA, Glynne R, Gileadi U, Beck S, Trowsdale J: Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1463, 1992.
  
- 11- de la Salle H, Hanau D, Fricker D, Urlacher A, Kelly A, Salamero J, Powis S, Donato L, Bausinger H, Laforet M, Jeras M, Spehner D, Bieber T, Falkenrodt A, Cazenave JP, Trowsdale J, Tongio MM: Homozygous Human TAP Peptide Transporter Mutation in HLA Class I Deficiency. *Science* 265:237, 1994.
  
- 12- Szafer F, Oksenberg JR, Steinman: New allelic polymorphisms in TAP genes. *Immunogenetics* 39:374, 1994.
  
- 13- Cano P, Baxter-Lowe LA: Novel human TAP2\*103 allele shows further polymorphism in the ATP-binding domain. *Tissue Antigens* 45:139, 1995.
  
- 14- Tang J, Allen S, Karita E, Musonda R, Kaslow RA: New TAP2 polymorphisms in Africans. *Tissue Antigens* 51:556, 1998.
  
- 15- Moins-Teisserenc HT, Gadola SD, Cella M, Dunbar PR, Exley A, Blake N, Baycal C, Lambert J, Bigliardi P, Willemsen M, Jones M, Buechner S, Colonna M, Gross WL, Cerundolo V: Association of a syndrome resembling Wegener's granulomatosis with low surface expression of HLA class-I molecules. *Lancet* 354:1598, 1999.
  
- 16- Keicho N, Tokunaga K, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Tanabe K, Matsushita M, Emi M, Ohishi N, Kudoh S: Contribution of TAP genes to genetic predisposition for diffuse panbronchiolitis. *Tissue Antigens* 53:366, 1999.
  
- 17- Marsh SGE, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Paharm P, Petersdorff EW, Sasazuki T, Schreuder GMTh, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI: Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Tissue Antigens* 57:236, 2001.
  
- 18- Powis SH, Tonks S, Mockridge I, Kelly AP, Bodmer JG, Trowsdale J: Alleles and haplotypes of the MHC-encoded ABC transporters TAP1 and TAP2. *Immunogenetics* 37:373, 1993.



- 19- Powis SH, Rosenberg WM, Hall M, Mockridge I, Tonks S, Ivanson A, Ciclitira PJ, Jewell DP, Lanchbourn JS, Bell JI, Trowsdale J: TAP1 and TAP2 polymorphism in coeliac disease. *Immunogenetics* 38:345, 1993.
- 20- Teisserenc H, Schmitt W, Blake N, Dunbar R, Gadola S, Gross WL, Exley A, Cerundolo V: A case of primary immunodeficiency due to a defect of the major histocompatibility gene complex class I processing and presentation pathway. *Immunol Lett* 57:183, 1997.
- 21- Rau H, Nicolay A, Usadel KH, Finke R, Donner H, Walfish PG, Badenhoop K: Polymorphisms of TAP1 and TAP2 genes in Graves' disease. *Tissue Antigens* 49:16, 1997.
- 22- Barron KS, Reveille JD, Carrington M, Mann DL, Robinson MA: Susceptibility to Reiter's syndrome is associated with alleles of TAP genes. *Arthritis Rheum* 38:684 1995.
- 23- Ishihara M, Ohno S, Mizuki N, Yamagata N, Naruse T, Shiina T, Kawata H, Kuwata S, Inoko H: Allelic variations in the TAP2 and LMP2 genes in Behcet's disease. *Tissue Antigens* 47:249, 1996.
- 24- Penforis A, Tuomilehto-Wolf E, Faustman DL, Hitman GA: Analysis of TAP2 polymorphisms in Finnish individuals with type I diabetes. *Hum Immunol* 63:61, 2002.
- 25- Jackson DG, Capra JD: TAP2 association with insulin-dependent diabetes mellitus is secondary to HLA-DQB1. *Hum Immunol* 43:57, 1995.
- 26- Rajalingam R, Singal DP, Mehra NK: Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens* 49:168, 1997.
- 27- Hohler T, Gerken G, Schneider PM, Meyer Zem Buschenfelde KH, Rittner C: Antigen-processing polymorphisms in chronic hepatitis C infection. *Exp Clin Immunogenet* 13:7, 1996.

- 28- Kuzushita N, Hayashi N, Kanto T, Takehara T, Tatsumi T, Katayama K, Ohkawa K, Ito A, Kasahara A, Moribe T, Sasaki Y, Hori M: Involvement of transporter associated with antigen processing 2 (TAP2) gene polymorphisms in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 116:1149, 1999.
- 29- Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Munoz A, Saah AJ, Goebert JJ, Winkler C, O'brien SJ, Rinaldo C, Detels R, Blattner W, Phair J, Erlich H, Mann DL: Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 2:405, 1996.
- 30- Mann DL, Garner RP, Dayhoff DE, Cao K, Fernandez-Vina MA, Davis C, Aronson N, Ruiz N, Birx DL, Michael NL: Major histocompatibility complex genotype is associated with disease progression and virus load levels in a cohort of human immunodeficiency virus type I- Infected Caucasians and African Americans. *J Infect Dis* 178:1799, 1998.
- 31- Keet IP, Tang J, Klein MR, Leblanc S, Enger C, Rivers C, Apple RJ, Mann D, Goegert JJ, Miedema F, Kaslow RA: Consistent associations of HLA class I and II and transporter gene products with progression of human immunodeficiency virus type I infection in homosexual men. *J Infect Dis* 180:299, 1999.
- 32- Parham P, Ohta T: Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* 272:67, 1996.
- 33- Matte C, Lacaille J, Zijenah L, Ward B, the Zvitambo Study Group, Roger M: HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. *Hum Immunol* 61:1150, 2000.
- 34- Matte C, Lacaille J, Zijenah L, Ward B, the Zvitambo Study Group, Roger M: HLA-G exhibits low level of polymorphism in indigenous East African. *Hum Immunol* 63:495, 2002.
- 35- Elliot T: Transporter associated with antigen processing. *Advances Immunol* 65:47, 1997.
- 36- van Endert PM, Tampe R, Meyer TH, Tisch R, Bach JF, McDevitt HO: A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* 1:491, 1994.

- 37- Müller K, Ebensberger C, Tampé R: Nucleotide binding to the hydrophobic C-terminal domain of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem* 269:14032, 1994.
- 38- Deverson EV, Leong L, Seeling A, Coadwell WJ, Tredgett EM, Butcher GW, Howard JC: Functional analysis by site-directed mutagenesis of the complex polymorphism in rat transporter associated with antigen processing. *J Immunol* 160:2767, 1998.
- 39- Momburg F, Armandola EA, Post M, Hammerling GJ: Residues in TAP2 peptide transporters controlling substrate specificity. *J Immunol* 156:1756, 1996.
- 40- Nijemhuis M, Hammerling GJ: Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J Immunol* 157:5467, 1996.
- 41- Tang J, Freedman DO, Allen S, Karita E, Musonda R, Braga C, Jamieson BD, Louie L, Kaslow RA: Genotyping TAP2 variants in North American Caucasians, Brazilians, and Africans. *Genes Immun* 2:32, 2001.
- 42- Armandola EA, Momburg F, Nijemhuis M, Bulbuc N, Fruh K, Hammerling GJ: A point mutation in the human transporter associated with antigen processing (TAP2) alters the peptide transport specificity. *Eur J Immunol* 26:1748, 1996.
- 43- Lankat-Buttgereit B, Tampe R : The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol Rev* 82:187, 2002.
- 44- Knittler MR, Alberts P, Deverson EV, Howard JC: Nucleotide binding by TAP mediates association with peptide and release of assembled MHC class I molecules. *Curr Biol* 9:999, 1999.
- 45- Lapinski PE, Neubig RR, Raghavan M: Walker A lysine mutations of TAP1 and TAP2 interfere with peptide translocation but not peptide binding. *J Biol Chem*. 276: 7526, 2001.

46- Saveanu L, Daniel S, van Endert PM: Distinct functions of the ATP binding cassettes of transporters associated with antigen processing: a mutational analysis of Walker A and B sequences. *J Biol Chem* 276:22107, 2001.

47- Kumagai S, Kanagawa S, Morinobu A, Takada M, Nakamura K, Sugai S, Maruya E, Saji H: Association of a new allele of the TAP2 gene, TAP2\*Bky2 (Val<sup>577</sup>) with susceptibility to Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 40:1685, 1997.

48- Ishihara M, Ohno S, Ishida T, Naruse T, Kagiya M, Mizuki N, Maruya E, Saji H, Inoko H: Analysis of allelic variation of the TAP2 gene in sarcoidosis. *Tissue Antigens* 49:107, 1997.

TABLE 1: Oligonucleotide primers used to amplify the coding region of TAP2 for SSCP and sequencing

Exon Name	Primer	Primer sequence temperature	Annealin (bp)	Fragment size
Exon 1	Tap2SSe1 Tap2ASe1	GAC AAG GAT TGG GAC TCC TCC TGA CTC ACC CAA AAC	57°C	561
Exon 2	Tap2SSe2 Tap2ASe2	GTG AGT TGG AGG TGG TAA AA TTA GGG AAG TGA AGA CCC CT	57°C	250
Exon 3	Tap2SSe3 Tap2ASe3	TGC TCC TTC TCT GCA TCT GGG ATG TCC ATG GGA AT	55°C	220
Exon 4	Tap2SSe4 Tap2ASe4	CCC TGC AGT ACA CAT GGT AAG CCT CCT CAC CTG TCA G	62°C	316
Exon 5	Tap2SSe5 TAP2eA56 <sup>a</sup>	ACT AGG GAG CAT CTC ACT GG CTT TCC TGG GCT CCT TTC	57°C	326
Exon 6	TAP2fS79 <sup>a</sup> Tap2ASe6	GAA GAT TCC CAG CCT CAT C AGA ACA AAT AAA GCC CAA GG	57°C	250
Exon 7	Tap2SSe7 Tap2ASe7	GTT TCT GGT AGA AGT GTG T CTG TGA TGT CCA ATT ATG	50°C	309
Exon 8	Tap2SSe8 Tap2ASe8	GGC AGG CCC TTA ACT CT CTC TGT ACA TGC TCC CCT CT	52°C	258
Exon 9	Tap2SSe9 Tap2ASe9	GGG GGT TTA CAC ATA GT TTT ACT GAA GGA GCA AG	50°C	241
Exon 10	Tap2SCP10 Tap2ACP10	GCT GTG CAC TTG TCC CTC CT CAG TCT GAT CCT CCC AGC CAT	62°C	278
Exon 11	TAP2kS16 <sup>a</sup> TAP2kA44 <sup>a</sup>	CTT TCT GAG GCA CTG TGA TC ACA GCT CTG GGT CCT GGA	57°C	265

<sup>a</sup>From [14]

**TABLE 2:** Primer sequences, annealing temperatures and restriction-endonuclease enzymes for A-RFLP typing of TAP2

Polymorphic site	Primer name	Primer sequence	Annealing temperature	Restriction enzyme
Codon 257	Tap2SSe4	CCC TGC AGT ACA CAT GGT	62°C	<i>Eco</i> 321 (Fermentas)
	Tap2ASe4	AAG CCT CCT CAC CTG TCA G		
Codon 313	Tap2SRF4	TAG CAG CGG AGA AGG TGT ACA ACA CGC	65°C	<i>Bst</i> UI (NEB)
	Tap2ARF4	CAA ATG TGG AAG CCT CCT CAC CTG TCA G		
Codon 374	Tap2SSe5	ACT AGG GAG CAT CTC ACT GG	57°C	<i>Bst</i> UI (NEB)
	Tap2eA56	CTT TCC TGG GCT CCT TTC		
Codon 609	Tap2SCP10	GCT GTG CAC TTG TCC CTC CT	62°C	<i>Bst</i> UI (NEB)
	Tap2ARF10	CCA GAC GTT GTT TCT GTC GC		

**TABLE 3:** TAP2 nucleotide sequence variations observed in Zimbabweans

Location	Nucleotide substitution	Genomic position	Amino acid change	Reference
Codon 15	GTG-GCG	40 471	Val → Ala	New
Codon 53	CTA-GTA	40 584	Leu → Val	New
Codon 220	CGA-AGA	42 947	None (Arg)	New
Codon 257	ACC-ATC	43 332	Thr → Ile	New
Codon 313	CGC-CAC	43 500	Arg → His	New
Codon 374	GCC-ACC	46 011	Ala → Thr	[14]
Codon 379	GTA-ATA	46 026	Val → Ile	[5]
Intron 5	TCTT (deletion)	46 184		[14]
Intron 5	3 <i>T-A</i>	46 194		[14]
Intron 5	<b>T-C</b>	46 195		[14]
Codon 386	GGG-GGT	46 214	None (Gly)	[13]
Codon 458	ACG-ACA	47 956	None (Thr)	[14]
Codon 466	GGG-GGA	47 980	None (Gly)	[14]
Codon 467	GTT-ATT	47 981	Val → Ile	[14]
Codon 565	GCT-ACT	48 629	Ala → Thr	[18]
Codon 604	GGA-GGG	49 141	None (Gly)	[16]
Codon 609	GCG-GTG	49 155	Ala → Val	New
Intron 10	<b>C-T</b>	49 270		[24]
Codon 665	ACA-GCA	49 687	Thr → Ala	[9,10]
Codon 687	TAG-CAG	49 753	Stop → Gln	[9,10]
Codon 697	GTG-GTT	49 785	None (Val)	[9,10]

Variant nucleotides are in bold.

**TABLE 4:** Allelic frequencies of TAP 2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in different populations

Population	Nb of alleles	T257I	R313H	A374T	V379I	A565T	A609V	R651C	T665A
Zimbabwean	384	3.4%	4.7%	9.1%	19.3%	13.5%	3.9%	0%	20.3%
<sup>a</sup> Caucasians	152	-	-	0%	18.4%	0.7%	-	5.3%	15.1%
<sup>a</sup> Brazilians	296	-	-	2.0%	13.2%	10.1%	-	4.0%	32.4%
<sup>a</sup> Rwandans	570	-	-	6.7%	11.8%	0%	-	10.0%	30.2%
<sup>a</sup> Zambians	234	-	-	6.8%	10.2%	18.3%	-	0%	23.5%

<sup>a</sup> From [41].

Abbreviation - = not determined.



## Résultats suite:

### Partie III :

Les résultats exposés précédemment dans les articles (partie I et II des résultats) compilent les données de la population totale que nous avons typée. Cette population zimbabwéenne totale est constituée de deux groupes, l'un étant composé de femmes VIH+ non apparentées et l'autre de femmes VIH- non apparentées. Les femmes sur lesquelles a porté cette étude ont été sélectionnées pour le projet ZVITAMBO qui consiste en une étude pour vérifier l'impact de la vitamine A sur la transmission verticale du HIV-1. Ces femmes sont dans la vingtaine et ont été recrutées lors de la naissance de l'enfant dans une des cliniques de Harare. Les échantillons utilisés pour notre étude proviennent de femmes VIH+ et VIH- recrutées de façon consécutive dans le groupe placebo (pas de traitement de vitamine A).

Les tableaux I à IV, que vous trouverez dans les deux prochaines parties, indiquent les résultats pour les deux groupes. Ainsi, nous avons comparé la fréquence obtenue pour certaines mutations typées dans les deux groupes (VIH+ et VIH-), afin de déterminer l'impact possible de ces mutations sur la susceptibilité à l'infection au VIH.

Les techniques utilisées pour l'identification et le typage des mutations sont des techniques couramment utilisées dans le domaine. D'ailleurs, plusieurs articles ayant effectués des études comparables à la nôtre ont employé ces techniques pour l'identification de mutations (Tang *et coll.*, 2001; Tang *et coll.*, 1998). Bien qu'il soit vrai que la polymérase (TAQ) utilisée fasse des erreurs lors de l'amplification (~1/26000 bases), les mutations peuvent être confirmées car plus d'une amplification a été effectuée pour chacun des échantillons. Ainsi, chaque échantillon a été amplifié une première fois pour les SSCP. Pour chacune des mutations identifiées, nous avons observé un patron de migration différent de celui obtenu pour les échantillons sans mutation. Suite à cela, une autre amplification des échantillons a été effectuée pour chaque patron de migration obtenu afin de séquencer les échantillons. Le séquençage

a été fait dans les deux sens (sens et anti-sens) de façon à s'assurer que les polymorphismes obtenus n'étaient pas dus au bruit de fond aperçu sur les électrophérogrammes. Ensuite, on a confirmé la présence de certaines de ces mutations par A-RFLP ou ARMS.

### **Fréquence des mutations dans les groupes VIH+ et VIH- pour TAP1**

Ainsi, après une première analyse de la séquence complète de l'ADN de TAP1 faite par SSCP et séquençage direct, nous avons identifié la présence de plusieurs mutations dans les régions codantes du gène. Nous avons typé les mutations localisées dans le domaine de liaison peptidique ou dans le domaine de liaison à l'ATP, et les polymorphismes choisis entraînent un changement d'acide aminé. Des mutations dans ces deux régions peuvent avoir une incidence importante sur l'accomplissement de la fonction du transporteur TAP. Pour TAP1, les mutations trouvées qui se retrouvent dans la région du domaine de liaison peptidique sont localisées aux codons 370, 419, 458 et 487. De ces cinq mutations, nous avons typé celles des codons 370 et 419. Le variant au codon 487 n'a pas été typé puisqu'il n'entraîne pas un changement d'acide aminé. Quant à la mutation au codon 458, même si elle conduit à un changement d'acide aminé, elle n'a pas été typée puisque nous pouvons connaître sa fréquence grâce à la distribution allélique. En effet, elle est en liaison avec l'allèle TAP1\*0401 et cet allèle peut également être déterminé par la présence d'une glutamine en 648.

En ce qui concerne le domaine de liaison à l'ATP, nous avons évalué la fréquence des mutations aux codons 637 et 648. Ces dernières mutations entraînent également une substitution d'acide aminé. La dernière mutation analysée est celle au codon 333. Celle-ci est située dans l'exon 4 qui code pour le pore. Nous avons déterminé la fréquence de cette mutation car cela est nécessaire pour l'identification des allèles. Il en est de même pour les polymorphismes des codons 637 et 648. Les fréquences alléliques obtenues pour chacune de ces mutations sont indiquées dans le

tableau I. La population VIH+ était composée de 93 sujets alors que la population VIH- était constituée de 100 sujets. Mentionnons que la mutation au codon 419 est une nouvelle mutation identifiée et qu'elle est présente dans presque 10% de notre population. Quatre des allèles officiels ont été retrouvés dans nos deux populations, soient : TAP1\*0101, TAP1\*0201, TAP1\*0301 et TAP1\*0401 (tableau II).

Tableau I : Distribution allélique de cinq mutations fonctionnelles de TAP1  
chez 93 individus VIH + et 100 individus VIH -

	VIH+ N=186		VIH- N=200		p
	Wt	mt	Wt	mt	
*I333V	65,05%	34,95%	67,50%	32,50%	0,61
**A370V	98,39%	1,61%	97,00%	3,00%	0,37
**G419C	89,25%	10,75%	90,00%	10,00%	0,58
*D637G	68,28%	31,72%	69,00%	31,00%	0,88
*R648Q	72,58%	27,42%	73,00%	27,00%	0,93

Légende : Wt : Allèle sauvage; mt :allèle mutant; N :nombre d'allèles;

\*Mutations permettant la détermination des allèles; \*\*Nouvelles mutations;

Valeur p mesurée par le test du chi-carré

Tableau II : Fréquence des allèles reconnus par l'organisation mondiale de la santé et basée sur les substitutions d'acides aminés pour TAP1, dans un groupe VIH+(93 individus) et un groupe VIH- (100 individus)

Allèles	VIH+ N=186(%)	VIH- N=200(%)	P
TAP1*0101	121(65,05%)	135(67,50%)	0,61
TAP1*0201	8(4,30%)	8 (4,00%)	0,88
TAP1*0301	6(3,23%)	3(1,50%)	0,26
TAP1*0402	51(27,42%)	54(27,00%)	0,93

Légende : N= nombre d'allèles; Valeur de p mesurée par le test du chi-carré

## Partie IV :

### Résultats des fréquences obtenues pour les populations VIH+ et VIH- dans le gène TAP2

En ce qui concerne le gène TAP2, les SSCP et le séquençage direct, nous ont permis d'identifier dix-sept sites polymorphiques. Comme mentionné dans l'article basé sur TAP2 (partie II), six de ces mutations sont mentionnées ici pour la première fois. Ces mutations, à l'exception d'une, entraînent un changement d'acide aminé. La substitution nucléotidique qui mène à une mutation silencieuse est située au codon 220 (Arg-Arg). Les autres nouvelles mutations sont situées aux codons 15 (Val→Ala), 53 (Leu→Val), 257 (Thr→Ile), 313(Arg→His) et 609(Ala→Val).

Comme pour TAP1, les mutations typées induisent un changement d'acide aminé et sont situées dans le domaine de liaison peptidique ou dans le domaine de liaison à l'ATP. Nous avons donc typé les mutations aux codons 257, 313, 374 et 379 car elles sont localisées dans la région des gènes codant pour le domaine de liaison peptidique. Mentionnons qu'on retrouve également au codon 467, une mutation qui entraîne un changement d'acide aminé. Le codon 467 est situé dans l'exon 7 qui code pour une partie du domaine de liaison peptidique. Nous n'avons pas typé la mutation à cette position car le codon 467 est situé à la fin de l'exon et que cette partie ne code plus pour le domaine de liaison peptidique.

Les mutations aux codons 379, 565 et 665, qui définissent les allèles de TAP2, ont été typés par ARMS (Powis *et coll.*, 1993) et les mutations aux codons 257, 313, 374 et 609 ont été typés par A-RFLP. Les résultats des fréquences obtenues pour chacune de ces mutations, dans les deux groupes, sont indiqués dans le tableau III. Chacune de ces mutations a été typée dans un groupe de 90 individus non apparentés VIH+ et 102 individus non apparentés VIH-. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux populations et ce pour chacune de ces mutations.



Mentionnons que la fréquence des mutations typées qui ne définissent pas un allèle particulier se situe en deçà de 10%.

Dans les mutations permettant de définir un allèle, il y a également la mutation au située au codon 687. Cette mutation permet de déterminer l'allèle TAP2\*0201. Bien que nous ayons retrouvé cette mutation dans notre population, nous n'avons cependant pas typé celle-ci, puisque grâce à la mutation au codon 665 nous pouvons identifier cet allèle. Cela nous indique que la fréquence obtenue pour l'allèle TAP2\*0201 correspond à la fréquence de la mutation au codon 687 (Stop-Gln.)

Pour TAP2, nous avons pu identifier trois des allèles officiels soient, TAP2\*0101, TAP2\*0201 et TAP2\*0102 ainsi que 2 allèles non officiels TAP2\*C et TAP2\*D. La fréquence de ces allèles est indiquée dans le tableau IV.

Tableau III : Distribution allélique de sept mutations individuelles situées dans les régions codantes du gène TAP2 pour un groupe de 90 individus non apparentés VIH+ et un groupe de 102 individus non apparentés VIH-.

	VIH+ N=180		VIH- N=204		
	Wt	mt	Wt	Mt	p
‡T257I	97,22%	2,78%	96,08%	3,92%	0,54
‡R313H	93,89%	6,11%	96,57%	3,43%	0,22
A374T	92,78%	7,22%	89,22%	10,78%	0,23
*V379I	78,89%	21,11%	82,35%	17,65%	0,61
*A565T	85,00%	15,00%	87,75%	12,25%	0,39
‡A609V	95,56%	4,44%	96,57%	3,43%	0,43
*T665A	78,89%	21,11%	80,39%	19,61%	0,71

Légende : Wt : Allèle sauvage; mt :allèle mutant; N :nombre d'allèles;

\*Mutations permettant la détermination des allèles; ‡ Nouvelles mutations;

Valeur de p mesurée par le test du chi-carré

Tableau IV : Fréquence des allèles reconnus par l'organisation mondiale de la santé, pour le gène TAP2 dans une population Zimbabwéenne composée de deux groupes : un constitué de 90 individus VIH+ et l'autre de 102 individus VIH-

Allèles	VIH+ N=180(%)	VIH- N=204(%)	p
TAP2*0101	86(47,78%)	109(53,43%)	0,27
TAP2*0201	38(21,11%)	41(20,10%)	0,81
TAP2*0102	18(10,00%)	18(8,82%)	0,69
TAP2*C	29(16,11%)	29(14,22%)	0,60
TAP2*D	9(5,00%)	7(3,43%)	0,44

Légende : N= nombre d'allèles; Valeur de p mesurée par le test du chi-carré.

## **Discussion :**

Le but de notre étude était de déterminer le polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 dans une population du Zimbabwe ainsi que de vérifier s'il y avait une association entre ces polymorphismes et la susceptibilité à l'infection au VIH. La population africaine choisie représente un groupe ancestral relativement homogène (Ethnie SHONA). Les premières traces officielles du peuple Shona en Afrique apparaissent durant le 11<sup>ème</sup> siècle. Au 15<sup>ème</sup> siècle, la dynastie des Shonas se sépara des autres ethnies présentes en Afrique du sud et forma l'état autonome du Rozwi qui est séparé par les rivières Zambezi et Limpopo. Cet état représente aujourd'hui le Zimbabwe (Mozambique history).

Les femmes shona utilisées lors de notre étude ont été sélectionnées après leur accouchement dans une clinique de Harare et étaient âgées d'une vingtaine d'année. Leur statut sérologique en ce qui a trait au VIH a été déterminé par ELISA et confirmé par immuno-buvardage (Western blot). Le mode d'infection au VIH est principalement hétérosexuel et bien que nous n'ayons pas le degré d'exposition des femmes VIH- mentionnons tout de même que 30% de la population est infectée par le VIH.

### **Les études génétiques en relation avec les maladies à traits complexes**

Le choix de la population dans une étude d'association génétique est un facteur important à prendre en considération. Le fait que le groupe étudié soit qualifié d'ancestral et d'homogène est une information notable pour l'analyse de nos résultats. En effet, un point important à prendre en considération lors d'une étude d'association génétique est la spécificité du groupe ethnique. Les populations génétiques théoriques et les données recueillies suggèrent qu'une population génétique isolée c'est-à-dire homogène est préférable à une large population mixte comme on en retrouve dans les grands centres urbains de nos jours. Dans une population mixte comme c'est le cas pour les populations des grands centres d'aujourd'hui, à peu près n'importe quel trait

présent à une haute fréquence peut montrer une association positive avec un allèle qui est commun dans le groupe. Ainsi, il devient difficile d'associer une mutation avec une maladie particulière. Il est donc important de bien choisir la population que l'on désire étudier. Dans notre cas, nous retrouvons dans notre population des femmes africaines d'origine zimbabwéenne de l'ethnie SHONA qui sont localisées à ou dans les environs de la ville d'Harare. Cette population représente une population ancestrale et homogène, ce qui, comme nous venons de le mentionner, est un point positif pour effectuer une étude génétique. Signalons également que le fait que nos sujets soient des femmes n'a pas d'impact sur les résultats de l'étude. En effet, les gènes TAP n'étant pas localisés sur le chromosome X ou Y, le sexe des sujets n'a pas une incidence sur les résultats.

Les études d'association génétique peuvent s'avérer ardues et ce, particulièrement lorsqu'on travaille sur une maladie dite à trait complexe. Cela signifie que cette maladie ne suit pas les règles de la loi de Mendel, c'est-à-dire qu'elle ne démontre pas le caractère hérité récessif ou dominant attribuable à un simple gène. En général, cette complexité apparaît lorsque la correspondance entre le génotype et le phénotype est brisée, car le même génotype peut résulter en plusieurs phénotypes (dû à un facteur environnemental, au hasard, aux interactions avec d'autres gènes) et vice-versa (Lander *et coll.* 1994). Le SIDA se retrouve dans cette catégorie de maladie. Ainsi, pour contrer les problèmes liés aux maladies à trait complexe, nous avons tout d'abord pris comme population deux groupes soit VIH+ et VIH- comprenant environ 93 et 100 individus respectivement. Cela représente un échantillonnage appréciable et le nombre d'échantillons permettent de savoir si les mutations ont un effet sur la protéine. Les individus pouvaient être classés de façon précise dans un des deux groupes puisqu'on ne détecte pas la présence de la maladie par des symptômes mais bien par des tests anti-VIH (dans notre cas par ÉLISA et immuno-buvardage) qui déterminent si la personne est infectée ou non par le virus. Ensuite, comme il l'a été illustré précédemment, pour diminuer le biais de stratification, nous avons effectué notre étude sur une population homogène au lieu d'une population mixte. De plus, de récentes études tendent à démontrer que les gènes que nous avons sélectionnés peuvent être en relation avec le SIDA. En effet, le

rôle de TAP porte à croire qu'il est important dans la lutte effectuée par notre système immunitaire contre le VIH. D'autre part, certains polymorphismes de TAP ont déjà été associés avec la progression de la maladie vers la phase SIDA. Donc, nous pouvons nous attendre à ce qu'il y ait une relation entre TAP et la susceptibilité à l'infection par le VIH.

### **Étude du polymorphisme du gène TAP 1**

L'étude de la séquence complète des régions codantes du gène TAP1 par séquençage direct a révélé la présence de 11 variations nucléotidiques dans la séquence d'ADN de la population Shona (Zimbabwe). De ces 11 mutations, huit entraînent un changement d'acide aminé et trois sont dites silencieuses. De plus, cinq de ces polymorphismes sont nouveaux et n'ont donc pas encore été décrits dans la littérature. Il s'agit des mutations situées aux codons 7, 17, 141, 419 et 487. Les autres polymorphismes, soient ceux localisés aux codons 254, 333, 370, 458, 637 et 648, ont été précédemment décrits dans la littérature et ont été retrouvés dans plusieurs populations. On ne peut pour l'instant dire si les mutations trouvées permettent de définir de nouveaux allèles. D'autres études doivent être accomplies pour pouvoir le déterminer.

Comme il l'a été mentionné précédemment, le transporteur TAP est un hétérodimère formé de deux sous-unités, soit TAP1 et TAP2. Des mutations dans l'une ou l'autre de ces sous-unités peuvent conduire à des déficiences dans la fonction du transporteur TAP. Le transport peptidique effectué par TAP requiert deux unités : une partie cytosolique qui est ATP-indépendante pour la liaison peptidique et une partie ATP-dépendante, à l'intérieure du RE, dans laquelle s'effectue le transport. Des mutations dans la région de liaison peptidique ou dans la région de liaison à l'ATP peuvent donc altérer le transport peptique accompli par le transporteur TAP. Certaines des mutations que nous avons trouvées se retrouvent dans ces deux régions. Ainsi, les mutations situées au codon 370 (résidu non polaire Ala pour un résidu non polaire Val), au codon 419 (résidu non polaire Gly pour une chaîne latérale polaire chargé Cys) et au codon 458 (résidu non polaire Val pour un résidu non polaire Leu)



sont situées dans la région de liaison peptidique. Dans cette région, nous avons également trouvé une mutation silencieuse en position 487. Une mutation dans ce domaine, particulièrement une mutation non silencieuse, peut affecter la capacité du transporteur à lier les peptides ou peut entraîner un changement dans l'affinité des peptides. La seconde région importante pour le transport, le domaine de liaison à l'ATP, comprend également des mutations. Ces mutations sont situées au codon 637 (chaîne latérale polaire chargé Asp pour une chaîne latérale non polaire Gly) et au codon 648 (chaîne latérale basique Arg pour une chaîne latérale polaire neutre Gln). Des mutations dans cette région peuvent empêcher la liaison de l'ATP ou son hydrolyse et, étant donné que TAP effectue un transport ATP dépendant, cela peut avoir pour conséquence d'inhiber le transport des peptides à l'intérieur du RE. Des études antérieures ont indiqué que la présence d'une délétion entre les acides aminés 366 à 405 bloque le transport peptidique par TAP (Ritz *et coll.*, 2001) et que les acides aminés 452 à 748 sont nécessaires pour la formation de l'hétérodimère. Les mutations typées se retrouvent dans ces régions (Lapinski *et coll.*, 2000), cependant aucune différence significative n'a été observée entre la population VIH+ et la population VIH- pour ces mutations. Cela tend à nous indiquer qu'une variation nucléotidique dans ces domaines n'aurait pas le même impact que celui qu'engendre une délétion. En effet, une délétion a pour conséquence d'inhiber le transport des peptides et donc par le fait même de réduire la réponse immunitaire. Nous pouvons donc nous attendre à ce que des mutations dans ces régions soient présentes de façon plus marquée chez les individus VIH+, puisque les mutations auraient inhiber le transport des peptides antigéniques du virus aux CMH de classe I et par conséquent aux CTL facilitant ainsi l'infection, mais ce ne fût pas le cas. D'autres études sont tout de même requises pour déterminer le réel impact des mutations décrites sur la stabilité, la liaison peptidique et à l'ATP ainsi que le transport par la protéine TAP.

Les autres mutations trouvées sont situées premièrement dans l'exon 1 qui code pour la partie N-terminale cytosolique de la protéine. Ces mutations sont localisées au codon 7 (résidu non polaire Pro pour un résidu avec chaîne polaire neutre Ser), au codon 17 (résidu non polaire Gly pour un résidu avec chaîne latérale

basique Arg) et une mutation silencieuse au codon 141. À notre connaissance, c'est la première fois que ces trois mutations sont décrites. La région N-terminale d'une protéine sert, en générale, à établir la conformation de cette dernière ainsi qu'à maintenir sa stabilité. Elle sert également d'ancrage ce qui est important pour la localisation de la protéine (Alberts *et coll.*, 1994). Des mutations dans la région codant pour la partie N-terminal de TAP peuvent donc avoir un impact sur la structure primaire de la protéine ainsi que sur son orientation. Comme une des différences entre les protéines TAP1 et TAP2 est la localisation de leur partie N-terminale, ces mutations dans l'exon 1 de TAP1 pourraient conduire à un changement de localisation de la partie N-terminale de TAP1. Pour vérifier cela, d'autres études devraient être effectuées. Les autres mutations des régions codantes identifiées dans notre analyse sont situées aux exons 2 et 4. Ces deux exons codent pour le pore (Ritz *et coll.*, 2001). On retrouve donc une mutation silencieuse au codon 254 et une autre mutation au codon 333 qui entraîne le changement d'une isoleucine pour une valine.

Nous pouvons donc constater que nous avons trouvé plus de polymorphismes dans notre population que ce qui a été observé lors d'études antérieures. Cela peut premièrement être dû au fait que nous avons vérifié la séquence nucléotidique de tous les exons de TAP1, et ce avec une technique qui est assez efficace. En effet, comme il l'a déjà été mentionné, la sensibilité des SSCP est de près de 95% (Taylor *et coll.*, 1997). Nous avons donc été capables, grâce à cette technique, d'identifier des mutations qui n'ont pu être observées lors d'études précédentes. De plus, nous avons effectué cette première analyse de la séquence de l'ADN sur 45 individus, ce qui est un nombre appréciable si on le compare à l'échantillonnage utilisé par d'autres études analysant TAP. La majorité des études portant sur l'analyse des polymorphismes de TAP1 n'ont, en plus, pas étudié tous les exons comme nous l'avons fait.

On doit par contre souligner que nous n'avons pas repéré toutes les mutations qui sont indiquées dans la littérature. Ainsi, nous n'avons pas aperçu les mutations aux codons 518, 659 et 661 (Yan *et coll.*, 1997 ; Chen *et coll.*, 1996; Szafer *et coll.*, 1994). La variation du codon 518 a été retrouvée dans une seule étude sur des patients caucasiens atteints de diabète (IDDM) (Yan *et coll.*, 1997). En ce qui

concerne la mutation au codon 659, celle-ci a été retrouvée uniquement dans des lignées cellulaires de tumeurs humaines et a été associée avec le cancer du poumon (Chen *et coll.*, 1996). La mutation au codon 661 a, quant à elle, été retrouvée dans la population caucasienne (Szafer *et coll.*, 1994) mais n'a pas été retrouvée chez les autres populations africaines étudiées comme les Zambiens (Tang *et coll.* 2001).

De plus, certaines mutations conduisent à un changement de la polarité de l'acide aminé présent dans la séquence protéinique. Les acides aminés qui ont des chaînes latérales polaires non chargées sont assez hydrophobes et sont habituellement à l'extérieur des protéines, alors que les chaînes latérales des acides aminés non polaire ont tendance à se regrouper à l'intérieur des molécules. Les acides aminés qui ont des chaînes latérales basiques ou acides sont très polaires et sont presque toujours présents à l'extérieur des molécules protéiques. La plupart des chaînes polypeptidiques ne se replient que selon une conformation particulière déterminée par leur séquence en acide aminé. Les propriétés des chaînes latérales des acides aminés déterminent les caractéristiques des protéines qu'ils constituent, et sont à l'origine de toutes les fonctions générales et sophistiquées de ces protéines. Ainsi, lorsque les mutations trouvées conduisent à un changement des propriétés des chaînes latérales, cela peut avoir un impact important sur la conformation de la protéine et donc, sur les fonctions de cette même protéine (Alberts *et coll.* 1994). Cependant, jusqu'à présent, il n'y a pas d'étude qui ont analysé l'impact particulier de chacune de ces mutations par des modèles de mutations dirigées. Les études effectuées sur le gène TAP1 ont plutôt tenté d'identifier les régions nécessaires pour la fonction de TAP1. C'est le cas des études de Vos *et coll.* et de Ritz *et coll.* qui ont démontré quelles sont les régions séquentielles importantes pour la fonction de TAP mais ces études n'ont pas étudié l'incidence de chaque changement d'acide aminé.

La distribution des allèles chez les personnes vivant dans les pays en développement peut différer de celle observée chez les personnes vivant dans les pays industrialisés. Cette différence peut s'expliquer par une pression sélective qui est exercée par les pathogènes présents uniquement dans ces régions (Parham *et coll.*,

1996.). L'analyse des variations aux codons 333, 637 et 648 révèle la présence de quatre allèles. Nos résultats confirment qu'il y a une différence inter-ethnique pour ce qui est de la distribution allélique. L'allèle prédominant dans notre population est l'allèle TAP1\*0101, ce qui correspond aux observations dans d'autres populations. La fréquence obtenue dans notre population (66,3%) est d'ailleurs similaire à celle observée dans d'autres populations africaines (~69%) mais est un peu plus faible que celle observée chez les Caucasiens et les Asiatiques (~80%) (Tang *et coll.*, 2001; Moins-Teisserenc *et coll.*, 1995; Hohler *et coll.*, 1996; Gonzalez-Escribano *et coll.*, 1995; Takeuchi *et coll.*, 1996; Faucz *et coll.*, 2000). Pour ce qui est de l'allèle Tap1\*0301, la fréquence que nous avons obtenue (2,3%) est un peu plus faible à celle observée chez les Caucasiens (~5%). Cet allèle est un facteur de risque pour la maladie de Grave.(Rau *et coll.*, 1997; Tang *et coll.*, 2001; Moins-Teisserenc *et coll.*, 1995; Hohler *et coll.*, 1996; Gonzalez-Escribano *et coll.*, 1995; Takeuchi *et coll.*, 1996; Faucz *et coll.*, 2000). La fréquence observée pour l'allèle TAP1\*0201 était de 4,2%. Ce pourcentage est similaire à celui constaté chez les Zambiens (2,8%) et les Rwandais (3,3%), qui sont deux populations africaines. Par contre, ce résultat est significativement plus faible que celui qui est observé chez les Caucasiens américains (9,9%;  $p=0,001$ ) et les Asiatiques (14,7%;  $p=0,001$ ) (Tang *et coll.*, 2001). Cet allèle a été associé avec le diabète de type I (IDDM) ainsi qu'avec la spondylite ankylosante chez les Caucasiens (Rau *et coll.*, 1997). Puisque cet allèle est retrouvé avec une fréquence beaucoup plus faible chez les Africains que chez les Caucasiens, on peut s'attendre à ce que le diabète de type I ainsi que la spondylite ankylosante soient moins présents dans la population africaine. Le dernier allèle que nous avons observé dans notre population est l'allèle TAP1\*0401(valine en 333, glycine en 637 et glutamine en 648) avec une fréquence de 27,2% ce qui est très proche de la fréquence observée chez les autres populations africaines (~23,8%). Par contre, par rapport à la fréquence observée chez les Caucasiens et les Asiatiques (~3,1%,  $p=0,001$ ) cela est beaucoup plus élevé (Tang *et coll.*, 2001). Cet allèle est un facteur de protection pour la maladie de Grave (Rau *et coll.*, 1997) mais un facteur de risque pour l'atopie chez les Tunisiens (Ismail *et coll.*, 1997). Un fait intéressant lorsqu'on regarde la distribution allélique est la différence entre les allèles TAP1\*0301 et TAP1\*0401.

Comme mentionné précédemment l'allèle TAP1\*0301 est associé avec la maladie de Grave alors que l'allèle TAP1\*0401 est un facteur de protection pour cette maladie. Nous avons observé que l'allèle TAP1\*0401 est plus fréquente chez les Africains que chez les Caucasiens et que l'allèle TAP1\*0301 est très peu fréquente chez les Africains. En regardant l'incidence de la maladie de Grave chez les Zimbabwéens indigènes, on constate que c'est une maladie qui est très rare (publication personnelle, Ministère de la santé du Zimbabwe) dans cette population, ce qui correspond à la distribution allélique observée. Finalement, la fréquence allélique de la valine au codon 333 (allèles TAP1\*0201, TAP1\*0301 et TAP1\*0401) qui a été associé avec une progression rapide vers le SIDA est de 30% chez les Africains, comparé à 18% chez les Caucasiens ( $p=0.001$ ) et à 14,7% ( $p=0.001$ ) chez les Asiatiques. Cette observation est difficile à interpréter puisque le changement d'acide aminé ne conduit pas à un changement de polarité et que cette mutation est située dans la partie codante pour le pore de TAP. L'association faite entre TAP et la progression vers le SIDA pourrait donc être due à un déséquilibre de liaison qui n'a pas encore été mis à jour.

### **Polymorphismes du gène TAP2**

L'analyse des séquences codantes du gène TAP2 par SSCP et séquençage direct a permis d'identifier dix-sept sites polymorphiques dans la population zimbabwéenne (ethnie Shona) et six d'entre eux sont des polymorphismes qui sont identifiés ici pour la première fois. Ces mutations se retrouvent aux codons 15, 53, 220, 257, 313 et 609 et, à l'exception de celle localisée au codon 220, ces mutations conduisent à un changement d'acide aminé. Les deux premières mutations, soient celle au codon 15 (valine pour alanine) et celle au codon 53 (leucine pour une valine), sont localisées dans l'exon 1 qui code pour le module N-terminal de la protéine. Pour les protéines en générale cette partie est responsable de la conformation de la protéine, elle confère une stabilité à la protéine et sert également d'ancrage (Alberts et coll., 1997). Ainsi, les mutations dans cette région pourraient affecter la conformation de TAP2 et/ou sa localisation. Naturellement, la partie N-terminale de TAP2 est cytosolique ce qui la différencie de celle de TAP1.

Comme il l'a été indiqué précédemment, le transport peptidique par TAP peut être divisé en deux étapes : liaison peptidique - ATP indépendante et transport du peptide – ATP dépendant. Des sites dans la séquence d'ADN de TAP2 (résidus 217/218; 262, 265, 268; 374, 380) ont d'ailleurs été identifiés pour leur implication dans la spécificité de la liaison aux substrats (Momburg *et coll.*, 1996; Deverson *et coll.*, 1998). Une étude de liaison croisée utilisant des peptides photo réactifs a défini que les résidus 301 à 433 de TAP2 sont impliqués dans la liaison du peptide au transporteur (Nijemhuis *et coll.*, 1996). Il a également été déterminé qu'une délétion dans le domaine Walker A empêche la liaison de l'ATP (Lapinski *et coll.*, 2001) et que les résidus 399 à 686 sont nécessaires pour la formation de l'hétérodimère TAP1-TAP2 (Lapinski *et coll.*, 2000). Pour TAP2, nous avons identifié cinq mutations dans le domaine de liaison peptidique dont quatre qui mènent à un changement d'acide aminé. Pour TAP2, ce domaine est codé par la fin de l'exon 4, l'exon 5 et 6 et par une partie de l'exon 7 (Vos *et coll.*, 1999). Nous avons ainsi typé les mutations situées au codon 257 (un résidu polaire non chargé Thr pour un résidu non polaire Ile), au codon 313 (un résidu polaire chargé Arg pour un résidu polaire chargé His), au codon 374 (un résidu non polaire Ala pour un résidu polaire non chargé Thr) et au codon 379 (un résidu non polaire Val pour un résidu non polaire Ile). Les deux premières mutations ont été retrouvées avec une fréquence de 3,4% et de 4,7% respectivement et sont répertoriées dans une population pour la première fois. La fréquence de la variation nucléotidique au codon 374 chez les Zimbabwéens (9,1%) est similaire à celle observée chez d'autres populations africaines (6,7%,  $p=0,18$ ) mais plus élevée que ce qui a été constaté chez les Caucasiens américains et les Brésiliens (0-2%,  $p=0,001$ ) (Tang *et coll.*, 2001). On peut donc constater que cette mutation est plus présente chez les Africains que chez les autres populations. Cela peut être dû, comme nous l'avons déjà mentionné, à la sélection positive exercée par les pathogènes rencontrés dans cette partie du monde (Parham *et coll.*, 1996). La mutation à cette position est particulièrement intéressante puisqu'une étude a démontré que le changement d'un acide aminé non polaire alanine pour un résidu polaire acide aspartique altère la spécificité du transport peptidique (Armandola *et coll.*, 1996). Bien que ce ne soit pas les mêmes acides aminés, la mutation observée

dans notre population entraîne le même changement de polarité que celui de l'étude de Armandola *et coll.*. Cette mutation est également connue pour entraîner une réduction de 70% du transport lorsqu'elle est présente. En effet, lorsqu'on est en présence d'une alanine, les peptides hydrophobes avec des groupes polaires chargés en C-terminal sont ceux qui sont les plus transportés et cela est différent lorsqu'on est en présence de la thréonine (Vos *et coll.*, 1999; Momburg *et coll.*, 1996; Armandola *et coll.*, 1996). Ainsi, puisque la présence de la mutation 374 conduit à un changement de la spécificité des acides aminés liés par TAP, sa présence dans notre population et dans les autres populations africaines nous porte à croire que les peptides qui sont présentés aux CTLs dans ces populations sont différents de ceux présentés dans la population caucasienne, et que la présence de cette mutation entraîne un transport moins efficace. Pour ce qui est de la mutation au codon 379, elle est présente dans notre population avec une fréquence de 19,3% et cela est similaire à ce qui observé dans d'autres populations (Tang *et coll.*, 2001).

Pour que le transport peptidique puisse se faire, il faut qu'il y ait liaison et hydrolyse d'ATP. Le domaine de liaison nucléotidique des deux sous-unités est nécessaire pour l'accomplissement de cette étape et des mutations dans un ou l'autre de ces domaines peut conduire à une perte du transport (Knittler *et coll.*, 1999 ; Saveanu *et coll.*, 2001). Pour la sous-unité TAP2, le domaine de liaison nucléotidique est codé principalement par les exons 8 et 10 (Élliot, 1997). Six mutations ont été répertoriées dans cette région dont quatre mènent à un changement d'acides aminés. Il s'agit des mutations au codon 565 (résidu non polaire Ala pour un résidu polaire non chargé Thr), au codon 609 (résidu non polaire Ala pour un résidu non polaire Val), au codon 665 (acide aminé polaire non chargée Thr pour un acide aminé non polaire Ala) et au codon 687 (codon stop pour une glutamine). Le variant Thr au codon 565 est relativement fréquente chez les Zimbabwéens de notre étude et les Zambiens (15,3%) mais est pratiquement absent chez les Caucasiens américains (0,7%,  $p=0,001$ ). L'inverse se produit pour la mutation au codon 651 qui est absente chez les Zimbabwéens et Zambiens mais est présent à 5,3% chez les Caucasiens. La mutation au codon 609, identifiée ici pour la première fois, a été retrouvée avec une fréquence de 3,9% et la mutation au codon 665 a été observée avec une fréquence de

20,3%. En ce qui concerne la variation au codon 687, nous n'avons pas typé cette mutation puisque sa fréquence peut nous être fournie par la fréquence de l'allèle TAP2\*0201, ce qui nous a donné une fréquence de 20,6%. La présence de cette mutation conduit à une protéine tronquée qui est plus longue que celle présente normalement. En effet celle-ci élimine le codon stop présent à la fin de l'exon 11 et cela entraîne la présence de dix-huit acides aminés supplémentaires. L'exon 11 codant la partie ABC terminale, celle-ci sera plus longue chez les individus qui possèdent cette mutation. Par contre, on ne connaît toujours pas l'impact de cette mutation sur la fonction de TAP.

Il est à signaler que même si nous avons trouvé un grand nombre de variations génétiques dans notre population, nous n'avons pas retrouvé toutes les mutations connues jusqu'à présent. Ainsi, nous n'avons pas rencontré la mutation localisée au codon 253 (Arg-stop) (De la salle *et coll.*, 1994) et celle située au codon 326 (Ala-Ala) (Moins *et coll.*, 1999). Ces deux mutations ont été retrouvées dans une seule étude chez des personnes atteintes d'une maladie très rare soit le syndrome du lymphocyte dénudé et, ont été retrouvés respectivement dans une famille marocaine et une famille turque. Deux autres mutations qui n'ont pas été identifiées dans cette étude sont situées aux codons 436 (Asn-Asn) et 513 (Ala-Ser) découvertes par Tang *et coll.* dans la population zambienne, (Tang *et coll.*, 1998). Ces substitutions n'ont, jusqu'à présent, pas été retrouvées dans d'autres populations. La dernière mutation qui n'a pas été retrouvée dans notre population est la substitution d'une méthionine pour une valine au codon 577 qui a été rencontrée uniquement dans une population asiatique (Keicho *et coll.*, 1999).

Mentionnons également que les amorces que nous avons utilisées pour effectuer le séquençage sont situées dans les introns, le séquençage direct nous a également permis de déterminer la présence de 4 mutations dans les introns. Ces mutations ont déjà été discutées lors d'études précédentes et se situent dans l'intron 5 (Tang *et coll.*, 1998) et dans l'intron 10 (Penfornis *et coll.*, 2002) et aucune de ces mutations n'est placée au niveau des sites d'épissage.



Certaines des mutations typées ont permis de déterminer la distribution allélique de notre population. Ainsi, le génotypage des mutations repérées aux codons 379, 565 et 665 a permis de déterminer la présence de 5 allèles. Trois d'entre eux sont des allèles officiels : TAP2\*0101, TAP2\*0102 et TAP2\*0201. Les autres allèles retrouvés sont les allèles TAP2\*C et TAP2\*D décrites par Powis *et coll* (1993). Nous n'avons pas retrouvé l'allèle TAP2\*0103 qui est caractérisé par la présence de la mutation au codon 651. L'allèle prédominant dans notre population Zimbabwéenne est l'allèle sauvage TAP2\*0101 qui a été observé avec une fréquence de 50,78%, ce qui est comparable à la fréquence observée dans chez les Caucasiens (53%). Cet allèle est associé avec la maladie de Behcet (Ishihira *et coll.*, 1996), la maladie de Grave (Rau *et coll.*, 1997) et avec la tuberculose (Rajalingam *et coll.*, 1997). Ensuite, nous avons retrouvé l'allèle TAP2\*0201 avec un taux de 20,58%. Cet allèle, selon les allèles HLA présents, est associé à un taux de progression rapide vers le SIDA. Pour ce qui est de l'allèle TAP2\*C, nous avons obtenu une fréquence de 15,1%, ce qui est presque deux fois plus élevée que la fréquence observée dans les populations asiatiques et caucasiennes (8,3% et 7,4% respectivement)(Faucz *et coll.*, 2000 ; Hühler *et coll.*, 1996). Cet allèle est également associé avec une progression rapide vers le SIDA et ce dépendamment des allèles HLA (Kaslow *et coll.*, 1996). La population africaine est celle qui est la plus touchée par le SIDA et, fait intéressant, deux des allèles les plus fréquents dans notre population sont des allèles qui favorisent la progression rapide vers le SIDA. La fréquence de l'allèle TAP2\*0102 était également plus élevée dans notre population que chez les Caucasiens (0,95%) mais est similaire à celle observé chez les Asiatiques (7,1%) (Faucz *et coll.*, 2000). Le dernier allèle observé est TAP2\*D. Nous l'avons rencontré avec une proportion de 4,17%, ce qui est passablement similaire au taux observé chez les Caucasiens. En ce qui concerne l'allèle TAP2\*0103, nous ne l'avons pas retrouvé dans notre population. Cet allèle n'est pas très fréquent et a été retrouvé avec une fréquence d'environ 1,5% dans la population caucasienne (Faucz *et coll.*, 2000).

## **Le polymorphisme des gènes TAP et la susceptibilité au VIH**

Comme plusieurs des mutations retrouvées dans notre population entraînent un changement d'acide aminé, ce qui peut avoir un impact sur la fonction de la protéine, et que certaines mutations ont déjà été associées avec la progression vers le SIDA, dans la deuxième partie de notre étude nous avons vérifié s'il y avait une association entre les polymorphismes des gènes TAP et la susceptibilité à l'infection au VIH.

Les mutations typées, pour vérifier l'hypothèse d'une association entre TAP et la susceptibilité à l'infection au VIH, étaient localisées dans les exons codant pour des régions importantes des protéines. D'ailleurs, pour TAP1 et TAP2, des séquences ont été identifiées pour leur implication dans la liaison aux peptides ou pour le transport peptidique. Ainsi, pour TAP1 des études de liaisons croisées ont déterminé que les résidus 362 à 487 étaient impliqués dans la liaison des peptides au transporteur. Certaines des mutations typées se retrouvent dans cette région mais aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes. Il en est de même pour les autres mutations.

Pour TAP2, les acides aminés situés entre les codons 399 à 686 sont essentielles pour la formation de l'hétérodimère TAP1-TAP2. Certaines des mutations que nous avons retrouvées dans notre population se situent dans cette zone. Il s'agit des mutations aux codons 565, 609, 651 et 665. Ces mutations pourraient donc avoir un impact important sur la formation du complexe TAP et donc la présence de ces mutations pourrait inhiber le transport peptide par TAP au CMH de classe I. Ces mutations ont été typées dans nos deux groupes afin de voir s'il y avait des différences de fréquences entre la population VIH- et la population VIH+. Aucune différence n'a été observée pour ces mutations.

Une autre mutation qui peut avoir un impact sur la fonction de TAP est celle localisée au codon 374. En effet, cette mutation réduit de 70% le transport peptidique lorsqu'elle est présente. La présence de cette mutation diminue donc la réponse

immunitaire engendrée par les CTL. Nous avons également typé cette mutation dans nos deux groupes et aucune différence significative n'a été observée.

Il nous faut mentionner que les résultats de notre étude sont en accord avec ceux obtenus dans l'étude réalisée par Obst *et coll.* Dans cette étude, il a été déterminé qu'il n'y a aucune mutation qui ait un impact sur le transport peptidique. Lorsqu'on compare les fréquences obtenues pour les diverses mutations dans les deux groupes typés, on peut constater que ces mutations n'ont probablement pas d'impact sur la susceptibilité au VIH. Par contre, nous ne pouvons dire si ces mutations ont une influence sur l'affinité peptidique. Des études mutationnelles dirigées *in vitro* devraient être entreprises pour confirmer le rôle de ces mutations sur la progression du VIH ou sur le développement d'autres maladies. De plus, le SIDA étant une maladie à trait complexe, il se peut que l'association entre TAP et la susceptibilité à l'infection au VIH soit multi-factorielle.

Ainsi, nos résultats pour TAP démontrent que la distribution des allèles diffère dans une population de pays en développement par rapport à celle d'un pays industrialisé. À première vue, les mutations typées n'ont pas d'impact sur la susceptibilité à l'infection au VIH dans notre population mais de futures études sont nécessaires pour comprendre l'impact de ces mutations et leur rôle dans la pathogenèse de l'infection par le VIH. Ces variations dans la séquence d'ADN peuvent également avoir un impact sur la susceptibilité à développer d'autres maladies. D'ailleurs, comme nous l'avons observé, certaines mutations ont déjà été associées à d'autres maladies et ces mutations peuvent également avoir un impact sur la susceptibilité à l'infection au VIH dans d'autres populations ou sur la progression de la maladie vers la phase SIDA. Ces deux derniers points restent encore à déterminer.

## **Conclusion :**

En conclusion, nous avons effectué une première étude exhaustive du polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 chez une population africaine provenant du Zimbabwe. Le but de cette étude était de déterminer les variations génétiques que l'on rencontre dans cette population et ensuite de vérifier si certaines de ces mutations avaient un impact sur la susceptibilité à l'infection au VIH. Il s'agit d'une étude importante à cause du nombre de sujets étudiés, de la population particulièrement à risque d'être infectée par le VIH, et à cause des techniques utilisées pour le dépistage des mutations, soit les SSCP ainsi que le séquençage direct pour confirmer la sensibilité du SSCP dans l'identification de mutations.

Nos résultats nous ont permis d'identifier le polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 chez les Africains du Zimbabwe. Ainsi, nous avons pu confirmer plusieurs mutations et en identifier d'autres qui n'ont jamais été décrites précédemment dans d'autres populations. Ainsi, nous avons rencontré onze mutations pour TAP1 et dix-sept variations nucléotidiques pour TAP2. Ces résultats confirment que les méthodes utilisées pour identifier des variations dans la séquence d'ADN étaient fiables et qu'elles sont adéquates pour ce genre d'étude.

Nous avons également évalué la fréquence de certaines des mutations trouvées. Les mutations typées se retrouvent dans des zones qui ont été précédemment décrites pour avoir un rôle important à jouer dans l'établissement de la fonction de TAP. Grâce à certaines de ces mutations, nous avons déterminé la distribution des allèles présents chez chaque individu. Nous avons donc retrouvé quatre allèles pour TAP1 et cinq allèles pour TAP2. Certaines différences en ce qui concerne la distribution allélique ont été observées entre les populations. Les différences remarquées entre ces populations pourraient être expliquées par la distribution des pathogènes dans les diverses parties du monde et par la pression exercée par ces pathogènes sur le système immunitaire.

Nous avons ensuite regardé les différences de distributions alléliques entre le groupe VIH+ et le groupe VIH- de notre population Zimbabwéenne afin de vérifier s'il y avait un impact sur la susceptibilité à l'infection au VIH. Nous n'avons pas constaté de différence entre les deux groupes. Cependant, c'était la première fois qu'une étude s'intéressait à l'impact de mutations dans les gènes TAP sur la susceptibilité à l'infection. Ainsi bien qu'à première vue il ne semble pas y avoir d'impact en ce qui concerne notre population, une telle relation peut exister dans une autre population. En effet, la distribution allélique pourrait avoir un impact sur la susceptibilité à l'infection chez des personnes à haut risque d'exposition au virus. Ces mutations peuvent également avoir une influence sur la progression de l'infection au VIH vers le SIDA. D'ailleurs, une des suites de ce projet portera sur ce dernier point.

De plus, notre cohorte étant initialement composée de mères et d'enfants, la prochaine étape sera de typer les enfants pour déterminer si la distribution allélique de TAP a un impact sur la transmission verticale du VIH.

Comme nous avons défini, pour la première fois, le polymorphisme présent chez les Zimbabwéens et identifié de nouvelles mutations, d'autres études pourraient être entreprises pour vérifier s'il y a une corrélation entre ces variants génétiques de TAP et des maladies infectieuses ou des cancers. De plus, il faudrait que soit réalisée des études sur l'impact qu'ont ces mutations sur la structure et la fonction de la protéine ainsi que sur la sélection peptidique.

## Références :

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (1997). Cellular and Molecular Immunology, Saunders Edition

Akuta, N., Chayama, K., Suzuki, F., Someya, T., Kobayashi, M., Tsubota, A., Suzuki, Y., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K., et Kumada, H.(2001). Risk factors of hepatitis C virus-related liver cirrhosis in young adults: positive family history of liver disease and transporter associated with antigen processing 2(TAP2)\*0201 Allele. *J Med Virol* **64**, 109-116.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Watson, J.D. (1997) La cellule. Troisième édition., Médecine –Sciences

Alberts, P., Daumke, O., Deverson, E.V., Howard, J.C., et Knittler, M.R.(2001). Distinct functional properties of the TAP subunits coordinate the nucleotide-dependent transport cycle. *Curr Biol* **11**, 242-251.

Androlewicz, M.J., Anderson, K.S., et Cresswell, P.(1993). Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9130-9134.

Androlewicz, M.J., Ortmann, B., van Endert, P.M., Spies, T., et Cresswell, P.(1994). Characteristics of peptide and major histocompatibility complex class I/beta 2-microglobulin binding to the transporters associated with antigen processing (TAP1 and TAP2). *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12716-12720.

Aoki, Y., Isselbacher, K.J., et Pillai, S.(1993). Polymorphisms involving the transmembrane domains of human TAP2. *Immunogenetics* **38**, 382

Armandola, E.A., Momburg, F., Nijenhuis, M., Bulbuc, N., Fruh, K., et Hammerling, G.J.(1996). A point mutation in the human transporter associated with antigen processing (TAP2) alters the peptide transport specificity. *Eur J Immunol* **26**, 1748-1755.

Arora, S., Lapinski, P.E., et Raghavan, M.(2001). Use of chimeric proteins to investigate the role of transporter associated with antigen processing (TAP) structural domains in peptide binding and translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7241-7246.

Bahram, S., Arnold, D., Bresnahan, M., Strominger, J.L., et Spies, T.(1991). Two putative subunits of a peptide pump encoded in the human major histocompatibility complex class II region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10094-10098.

Barron, K.S., Reveille, J.D., Carrington, M., Mann, D.L., et Robinson, M.A.(1995). Susceptibility to Reiter's syndrome is associated with alleles of TAP genes. *Arthritis Rheum* **38**, 684-689.

Beck, S., Kelly, A., Radley, E., Khurshid, F., Alderton, R.P., et Trowsdale, J.(1992). DNA sequence analysis of 66 kb of the human MHC class II region encoding a cluster of genes for antigen processing. *J Mol Biol* **228**, 433-441.

Brown, M.G., Driscoll, J., et Monaco, J.J.(1991). Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* **353**, 355-357.

Brusic, V., van Endert, P., Zeleznikow, J., Daniel, S., Hammer, J., et Petrovsky, N.(1999). A neural network model approach to the study of human TAP transporter. *In Silico Biol* **1**, 109-121.

Caillat-Zucman, S., Bertin, E., Timsit, J., Boitard, C., Assan, R., et Bach, J.F.(1993). Protection from insulin-dependent diabetes mellitus is linked to a peptide transporter gene. *Eur J Immunol* **23**, 1784-1788.

Cano, P. et Baxter-Lowe, L.A.(1995). Novel human TAP2\*103 allele shows further polymorphism in the ATP-binding domain. *Tissue Antigens* **45**, 139-142.

Carrington, M., Colonna, M., Spies, T., Stephens, J.C., et Mann, D.L.(1993). Haplotypic variation of the transporter associated with antigen processing (TAP) genes and their extension of HLA class II region haplotypes. *Immunogenetics* **37**, 266-273.

- Chen, H.L., Gabrilovich, D., Tampe, R., Girgis, K.R., Nadaf, S., et Carbone, D.P.(1996). A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer [see comments]. *Nat Genet* **13**, 210-213.
- Colonna, M., Bresnahan, M., Bahram, S., Strominger, J.L., et Spies, T.(1992). Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3932-3936.
- Cramer, L.A., Nelson, S.L., et Klemsz, M.J.(2000). Synergistic induction of the Tap-1 gene by IFN-gamma and lipopolysaccharide in macrophages is regulated by STAT1. *J Immunol* **165**, 3190-3197.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., et Diedrich, G.(1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev* **172**, 21-28.
- Davies, E.J., Donn, R.P., Hillarby, M.C., Grennan, D.M., et Ollier, W.E.(1994). Polymorphisms of the TAP2 transporter gene in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **53**, 61-63.
- de la Salle, H., Hanau, D., Fricker, D., Urlacher, A., Kelly, A., Salamero, J., Powis, S.H., Donato, L., Bausinger, H., et Laforet, M.(1994). Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency [published erratum appears in Science 1994 Dec 2;266(5190):1464]. *Science* **265**, 237-241.
- de la Salle, H., Zimmer, J., Fricker, D., Angenieux, C., Cazenave, J.P., Okubo, M., Maeda, H., Plebani, A., Tongio, M.M., Dormoy, A., et Hanau, D.(1999). HLA class I deficiencies due to mutations in subunit 1 of the peptide transporter TAP1. *J Clin Invest* **103**, R9-R13
- Deverson, E.V., Gow, I.R., Coadwell, W.J., Monaco, J.J., Butcher, G.W., et Howard, J.C.(1990). MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* **348**, 738-741.
- Doige, C.A. et Ames, G.F.(1993). ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol* **47**, 291-319.



Elliott, T.(1997). How does TAP associate with MHC class I molecules? *Immunol Today* **18**, 375-379.

Elliot,T. (1997) Transporter Associated with Antigen Processing. *Advances in Immunology* **65**, 47-109

Evans, M., Borysiewicz, L.K., Evans, A.S., Rowe, M., Jones, M., Gileadi, U., Cerundolo, V., et Man, S.(2001). Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *J Immunol* **167**, 5420-5428.

Faucz, F.R., Probst, C.M., et Petzl-Erler, M.L.(2000). Polymorphism of LMP2, TAP1, LMP7 and TAP2 in Brazilian Amerindians and Caucasoids: implications for the evolution of allelic and haplotypic diversity. *Eur J Immunogenet* **27**, 5-16.

Ford, R.C., Hefti, A., et Engel, A.(1990). Ordered arrays of the photosystem I reaction centre after reconstitution: projections and surface reliefs of the complex at 2 nm resolution. *EMBO J* **9**, 3067-3075.

Frisan, T., Zhang, Q.J., Levitskaya, J., Coram, M., Kurilla, M.G., et Masucci, M.G.(1996). Defective presentation of MHC class I-restricted cytotoxic T-cell epitopes in Burkitt's lymphoma cells. *Int J Cancer* **68**, 251-258.

Furukawa, H., Murata, S., Yabe, T., Shimbara, N., Keicho, N., Kashiwase, K., Watanabe, K., Ishikawa, Y., Akaza, T., Tadokoro, K., Tohma, S., Inoue, T., Tokunaga, K., Yamamoto, K., Tanaka, K., et Juji, T.(1999a). Splice acceptor site mutation of the transporter associated with antigen processing-1 gene in human bare lymphocyte syndrome. *J Clin Invest* **103**, 755-758.

Furukawa, H., Yabe, T., Akaza, T., Tadokoro, K., Tohma, S., Inoue, T., Tokunaga, K., Yamamoto, K., Geraghty, D.E., et Juji, T.(1999b). Cell surface expression of HLA-E molecules on PBMC from a TAP1-deficient patient. *Tissue Antigens* **53**, 292-295.

Gambaro, G., Anglani, F., et D'angelo, A. (2000). Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *The Lancet* **355**, 308-311.

Gaudet, R. et Wiley, D.C.(2001). Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J* **20**, 4964-4972.

Georgopoulos, N.T., Proffitt, J.L., et Blair, G.E.(2000). Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* **19**, 4930-4935.

Gonzalez-Escribano, M.F., Morales, J., Garcia-Lozano, J.R., Castillo, M.J., Sanchez-Roman, J., Nunez-Roldan, A., et Sanchez, B.(1995). TAP polymorphism in patients with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* **54**, 386-388.

Gorbulev, S., Abele, R., et Tampe, R.(2001). Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3732-3737.

Gournier, H., Pascolo, S., Siegrist, C.A., Jehan, J., Perarnau, B., Garcia, Z., Rose, T., Neefjes, J., et Lemonnier, F.A.(1995). Restriction of self-antigen presentation to cytolytic T lymphocytes by mouse peptide pumps. *Eur J Immunol* **25**, 2019-2026.

Grande, A.G., Lehner, P.J., Cresswell, P., et Spies, T.(1997). Regulation of MHC class I heterodimer stability and interaction with TAP by tapasin. *Immunogenetics* **46**, 477-483.

Greenwood, R., Shimizu, Y., Sekhon, G.S., et DeMars, R.(1994). Novel allele-specific, post-translational reduction in HLA class I surface expression in a mutant human B cell line. *J Immunol* **153**, 5525-5536.

Hammerling, G.J., Vogt, A.B., et Kropshofer, H.(1999). Antigen processing and presentation—towards the millennium. *Immunol Rev* **172**, 5-9.

Harty, L.C., Lin, A.Y., Goldstein, A.M., Jaffe, E.S., Carrington, M., Tucker, M.A., et Modi, W.S.(2002). HLA-DR, HLA-DQ, and TAP genes in familial Hodgkin disease. *Blood* **99**, 690-693.

Herberg, J.A., Sgouros, J., Jones, T., Copeman, J., Humphray, S.J., Sheer, D., Cresswell, P., Beck, S., et Trowsdale, J.(1998). Genomic analysis of the Tapasin gene, located close to the TAP loci in the MHC. *Eur J Immunol* **28**, 459-467.

Hewitt, E.W., Gupta, S.S., et Lehner, P.J.(2001). The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *EMBO J* **20**, 387-396.

Higgins, C.F.(1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113.

Higgins, C.F. et Linton, K.J.(2001). Structural biology. The xyz of ABC transporters. *Science* **293**, 1782-1784.

Hilton, C.J., Dahl, A.M., et Rock, K.L.(2001). Anti-peptide antibody blocks peptide binding to MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *J Immunol* **166**, 3952-3956.

HLA Informations groups: [www.anthonynolan.com/HIG/index.html](http://www.anthonynolan.com/HIG/index.html)

Hohler, T., Weinmann, A., Schneider, P.M., Rittner, C., Schopf, R.E., Knop, J., Hasenclever, P., Meyer, z.B.K., et Marker-Hermann, E.(1996). TAP-polymorphisms in juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. *Hum Immunol* **51**, 49-54.

Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F., et Kim, S.H.(1998). Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396**, 703-707.

Ishihara, M., Ohno, S., Ishida, T., Naruse, T., Kagiya, M., Mizuki, N., Maruya, E., Saji, H., et Inoko, H.(1997). Analysis of allelic variation of the TAP2 gene in sarcoidosis. *Tissue Antigens* **49**, 107-110.

Ishihara, M., Ohno, S., Mizuki, N., Yamagata, N., Naruse, T., Shiina, T., Kawata, H., Kuwata, S., et Inoko, H.(1996). Allelic variations in the TAP2 and LMP2 genes in Behcet's disease. *Tissue Antigens* **47**, 249-252.

Ismail, A., Bousaffara, R., Kaziz, J., Zili, J., el Kamel, A., Tahar, S.M., Remadi, S., et Chouchane, L.(1997). Polymorphism in transporter antigen peptides gene (TAP1) associated with atopy in Tunisians. *J Allergy Clin Immunol* **99**, 216-223.

Jackson, D.G. et Capra, J.D.(1993). TAP1 alleles in insulin-dependent diabetes mellitus: a newly defined centromeric boundary of disease susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11079-11083.

Kallfelz, M., Jung, D., Hilmes, C., Knuth, A., Jaeger, E., Huber, C., et Seliger, B.(1999). Induction of immunogenicity of a human renal-cell carcinoma cell line by TAP1-gene transfer. *Int J Cancer* **81**, 125-133.

Kamarashev, J., Ferrone, S., Seifert, B., Boni, R., Nestle, F.O., Burg, G., et Dummer, R.(2001). TAP1 down-regulation in primary melanoma lesions: an independent marker of poor prognosis. *Int J Cancer* **95**, 23-28.

Karttunen, J.T., Lehner, P.J., Gupta, S.S., Hewitt, E.W., et Cresswell, P.(2001). Distinct functions and cooperative interaction of the subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7431-7436.

Kaslow, R.A., Carrington, M., Apple, R., Park, L., Munoz, A., Saah, A.J., Goedert, J.J., Winkler, C., O'Brien, S.J., Rinaldo, C., Detels, R., Blattner, W., Phair, J., Erlich, H., et Mann, D.L.(1996). Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* **2**, 405-411.

Keicho, N., Tokunaga, K., Nakata, K., Taguchi, Y., Azuma, A., Tanabe, K., Matsushita, M., Emi, M., Ohishi, N., et Kudoh, S.(1999). Contribution of TAP genes to genetic predisposition for diffuse panbronchiolitis. *Tissue Antigens* **53**, 366-373.

Keet, I.P.M, Tang, J., Kelen, M., Leblanc, S., Miedema, F., Goudsmit, S., Carrington, M., Coutinho, P.A et Kaslow, R.A., (1997). Consistent associations between HLA and time to Aids in three prospective seroconverters cohorts, The 4<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and opportunistic infections

Kleijmeer, M.J., Kelly, A., Geuze, H.J., Slot, J.W., Townsend, A., et Trowsdale, J.(1992). Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* **357**, 342-344.

Klein, I., Sarkadi, B., et Varadi, A.(1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 237-262.

Knittler, M.R., Alberts, P., Deverson, E.V., et Howard, J.C.(1999). Nucleotide binding by TAP mediates association with peptide and release of assembled MHC class I molecules. *Curr Biol* **9**, 999-1008.

Konno, Y., Numaga, J., Mochizuki, M., Mitsui, H., Hirata, R., et Maeda, H.(1998). TAP polymorphism is not associated with ankylosing spondylitis and complications with acute anterior uveitis in HLA-B27-positive Japanese. *Tissue Antigens* **52**, 478-483.

Koopmann, J.O., Post, M., Neefjes, J.J., Hammerling, G.J., et Momburg, F.(1996). Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur J Immunol* **26**, 1720-1728.

Kumagai, S., Kanagawa, S., Morinobu, A., Takada, M., Nakamura, K., Sugai, S., Maruya, E., et Saji, H.(1997). Association of a new allele of the TAP2 gene, TAP2\*Bky2 (Val577), with susceptibility to Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* **40**, 1685-1692.

Kuwata, S., Yanagisawa, M., Saeki, H., Nakagawa, H., Etoh, T., Tokunaga, K., Juji, T., et Shibata, Y.(1994). Polymorphisms of transporter associated with antigen processing genes in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **94**, 565-574.

Kuwata, S., Yanagisawa, M., Saeki, H., Nakagawa, H., Etoh, T., Tokunaga, K., Juji, T., et Shibata, Y.(1995). Lack of primary association between transporter associated with antigen processing genes and atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **96**, 1051-1060.

Kuzushita, N., Hayashi, N., Kanto, T., Takehara, T., Tatsumi, T., Katayama, K., Ohkawa, K., Ito, A., Kasahara, A., Moribe, T., Sasaki, Y., et Hori, M.(1999). Involvement of transporter associated with antigen processing 2 (TAP2) gene polymorphisms in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **116**, 1149-1154.

Lander, E.S., et Schork, N.J. (1994). Genetic Dissection of Complex Traits. *Science* **265**, 2037-2047

Lankat-Buttgereit, B. et Tampe, R.(1999). The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. *FEBS Lett* **464**, 108-112.

Lankat-Buttgereit, B. et Tampe, R.(2002). The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol Rev* **82**, 187-204.

Lapinski, P.E., Miller, G.G., Tampe, R., et Raghavan, M.(2000). Pairing of the nucleotide binding domains of the transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem* **275**, 6831-6840.

Lapinski, P.E., Neubig, R.R., et Raghavan, M.(2001). Walker A lysine mutations of TAP1 and TAP2 interfere with peptide translocation but not peptide binding. *J Biol Chem* **276**, 7526-7533.

Lehner, P.J., Surman, M.J., et Cresswell, P.(1998). Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity* **8**, 221-231.

Lewis, J.W. et Elliott, T.(1998). Evidence for successive peptide binding and quality control stages during MHC class I assembly. *Curr Biol* **8**, 717-720.

Lewis, J.W., Sewell, A., Price, D., et Elliott, T.(1998). HLA-A\*0201 presents TAP-dependent peptide epitopes to cytotoxic T lymphocytes in the absence of tapasin. *Eur J Immunol* **28**, 3214-3220.

Li, S., Sjogren, H.O., Hellman, U., Pettersson, R.F., et Wang, P.(1997). Cloning and functional characterization of a subunit of the transporter associated with antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8708-8713.

Li, Y., Salter-Cid, L., Vitiello, A., Preckel, T., Lee, J.D., Angulo, A., Cai, Z., Peterson, P.A., et Yang, Y.(2000). Regulation of transporter associated with antigen processing by phosphorylation. *J Biol Chem* **275**, 24130-24135.

Ljunggren, H.G., Stam, N.J., Ohlen, C., Neefjes, J.J., Hoglund, P., Heemels, M.T., Bastin, J., Schumacher, T.N., Townsend, A., et Karre, K.(1990). Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* **346**, 476-480.

Loo, T.W. et Clarke, D.M.(1995). Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein. *J Biol Chem* **270**, 843-848.

Maksymowych, W.P., Tao, S., Li, Y., Wing, M., et Russell, A.S.(1995). Allelic variation at the TAP 1 locus influences disease phenotype in HLA-B27 positive individuals with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* **45**, 328-332.

Meyer, T.H., van Endert, P.M., Uebel, S., Ehring, B., et Tampe, R.(1994). Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett* **351**, 443-447.

Moins-Teisserenc, H., Semana, G., Alizadeh, M., Loiseau, P., Bobrynina, V., Deschamps, I., Edan, G., Birebent, B., Genetet, B., et Sabouraud, O.(1995). TAP2 gene polymorphism contributes to genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Hum Immunol* **42**, 195-202.

Moins-Teisserenc, H.T., Gadola, S.D., Cella, M., Dunbar, P.R., Exley, A., Blake, N., Baykal, C., Lambert, J., Bigliardi, P., Willemsen, M., Jones, M., Buechner, S., Colonna, M., Gross, W.L., et Cerundolo, V.(1999). Association of a syndrome resembling Wegener's granulomatosis with low surface expression of HLA class-I molecules. *Lancet* **354**, 1598-1603.

Momburg, F., Armandola, E.A., Post, M., et Hammerling, G.J.(1996). Residues in TAP2 peptide transporters controlling substrate specificity. *J Immunol* **156**, 1756-1763.

Momburg, F. et Hammerling, G.J.(1998). Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv Immunol* **68**, 191-256.

Mozambique history :

[www.jlhs.k12.ca.us/Classes/Social\\_Science/Mozambique/Mozambique\\_history.html](http://www.jlhs.k12.ca.us/Classes/Social_Science/Mozambique/Mozambique_history.html)

Monaco, J.J., Cho, S., et Attaya, M.(1990). Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing. *Science* **250**, 1723-1726.

Niedermann, G., Geier, E., Lucchiari-Hartz, M., Hitziger, N., Ramsperger, A., et Eichmann, K.(1999). The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens. *Immunol Rev* **172**, 29-48.

Nijenhuis, M., Schmitt, S., Armandola, E.A., Obst, R., Brunner, J., et Hammerling, G.J.(1996). Identification of a contact region for peptide on the TAP1 chain of the transporter associated with antigen processing. *J Immunol* **156**, 2186-2195.

- Nijenhuis M., Hammerling GJ (1996). Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J Immunol* **157**, 5467-
- Nossner, E. et Parham, P.(1995). Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules. *J Exp Med* **181**, 327-337.
- Obst, R., Armandola, E.A., Nijenhuis, M., Momburg, F., and Hammerling, G.J.(1995). TAP polymorphism does not influence transport of peptide variants in mice and humans. *Eur J Immunol* **25**, 2170-2176.
- Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P.J., Sadasivan, B., Herberg, J.A., Grandea, A.G., Riddell, S.R., Tampe, R., Spies, T., Trowsdale, J., et Cresswell, P.(1997). A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* **277**, 1306-1309.
- Pamer, E. et Cresswell, P.(1998). Mechanisms of MHC class I—restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* **16**, 323-358.
- Peace-Brewer, A.L., Tussey, L.G., Matsui, M., Li, G., Quinn, D.G., et Frelinger, J.A.(1996). A point mutation in HLA-A\*0201 results in failure to bind the TAP complex and to present virus-derived peptides to CTL. *Immunity* **4**, 505-514.
- Penforis, A., Tuomilehto-Wolf, E., Faustman, D.L., et Hitman, G.A.(2002). Analysis of TAP2 polymorphisms in Finnish individuals with type I diabetes. *Hum Immunol* **63**, 61-70.
- Parham, P., Ohta, T.(1996) Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* **272**, 67-73
- Ploegh, H.L.(1998). Viral strategies of immune evasion. *Science* **280**, 248-253.
- Powis, S.H., Mockridge, I., Kelly, A., Kerr, L.A., Glynn, R., Gileadi, U., Beck, S., et Trowsdale, J.(1992). Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1463-1467.



- Powis, S.H., Rosenberg, W.M., Hall, M., Mockridge, I., Tonks, S., Ivinson, A., Ciclitira, P.J., Jewell, D.P., Lanchbury, J.S., et Bell, J.I.(1993b). TAP1 and TAP2 polymorphism in coeliac disease. *Immunogenetics* **38**, 345-350.
- Powis, S.H., Tonks, S., Mockridge, I., Kelly, A.P., Bodmer, J.G., et Trowsdale, J.(1993a). Alleles and haplotypes of the MHC-encoded ABC transporters TAP1 and TAP2 [published erratum appears in *Immunogenetics* 1993;37(6):480]. *Immunogenetics* **37**, 373-380.
- Powis, S.J., Townsend, A.R., Deverson, E.V., Bastin, J., Butcher, G.W., et Howard, J.C.(1991). Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature* **354**, 528-531.
- Rajalingam, R., Singal, D.P., et Mehra, N.K.(1997). Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens* **49**, 168-172.
- Rau, H., Nicolay, A., Donner, H., Usadel, K.H., et Badenhoop, K.(1997). Polymorphisms of TAP1 and TAP2 genes in German patients with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Immunogenet* **24**, 229-236.
- Rau, H., Nicolay, A., Usadel, K.H., Finke, R., Donner, H., Walfish, P.G., et Badenhoop, K.(1997). Polymorphisms of TAP1 and TAP2 genes in Graves' disease. *Tissue Antigens* **49**, 16-22.
- Reits, E.A., Vos, J.C., Gromme, M., et Neefjes, J.(2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* **404**, 774-778.
- Ritz, U., Momburg, F., Pircher, H.P., Strand, D., Huber, C., et Seliger, B.(2001). Identification of sequences in the human peptide transporter subunit TAP1 required for transporter associated with antigen processing (TAP) function. *Int Immunol* **13**, 31-41.
- Ritz, U. et Seliger, B.(2001). The transporter associated with antigen processing (TAP): structural integrity, expression, function, and its clinical relevance. *Mol Med* **7**, 149-158.

- Roger, M.(1998). Influence of host genes on HIV-1 disease progression. *FASEB J* **12**, 625-632.
- Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T., et Cresswell, P.(1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* **5**, 103-114.
- Sadee, W., Drubbisch, V., et Amidon, G.L.(1995). Biology of membrane transport proteins. *Pharm Res* **12**, 1823-1837.
- Saric,T., Chang, S.C., Hattori, A., York I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M., Goldberg, A.I.(2002). An IFN- $\gamma$ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nature immunology* **3**, 1169-1176.
- Saveanu, L., Daniel, S., et van Endert, P.M.(2001). Distinct functions of the ATP binding cassettes of transporters associated with antigen processing: a mutational analysis of Walker A and B sequences. *J Biol Chem* **276**, 22107-22113.
- Schumacher, T.N., Kantesaria, D.V., Heemels, M.T., Ashton-Rickardt, P.G., Shepherd, J.C., Fruh, K., Yang, Y., Peterson, P.A., Tonegawa, S., et Ploegh, H.L.(1994). Peptide length and sequence specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator. *J Exp Med* **179**, 533-540.
- Seliger, B., Harders, C., Lohmann, S., Momburg, F., Urlinger, S., Tampe, R., et Huber, C.(1998). Down-regulation of the MHC class I antigen-processing machinery after oncogenic transformation of murine fibroblasts. *Eur J Immunol* **28**, 122-133.
- Seliger, B., Maeurer, M.J., et Ferrone, S.(2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* **21**, 455-464.
- Singal, D.P., Ye, M., et Bienzle, D.(1998). Transfection of TAP 1 gene restores HLA class I expression in human small-cell lung carcinoma. *Int J Cancer* **75**, 112-116.
- Solheim, J.C.(1999). Class I MHC molecules: assembly and antigen presentation. *Immunol Rev* **172**, 11-19.

Sorrentino, B.P., Brandt, S.J., Bodine, D., Gottesman, M., Pastan, I., Cline, A., et Nienhuis, A.W.(1992). Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science* **257**, 99-103.

Spies, T., Bresnahan, M., Bahram, S., Arnold, D., Blanck, G., Mellins, E., Pious, D., et DeMars, R.(1990). A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* **348**, 744-747.

Spies, T. et DeMars, R.(1991). Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* **351**, 323-324.

Spiliotis, E.T., Manley, H., Osorio, M., Zuniga, M.C., et Edidin, M.(2000). Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP. *Immunity* **13**, 841-851.

Szafer, F., Oksenberg, J.R., et Steinman, L.(1994). New allelic polymorphisms in TAP genes. *Immunogenetics* **39**, 374

Takeuchi, F., Nakano, K., Matsuta, K., Takizawa, K., Nabeta, H., Kuwata, S., et Ito, K.(1997a). Polymorphism of TAP1 and TAP2 in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* **49**, 280-282.

Takeuchi, F., Nakano, K., Matsuta, K., Takizawa, K., Nabeta, H., Kuwata, S., et Ito, K.(1997b). Polymorphism of TAP1 and TAP2 in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* **49**, 280-282.

Takeuchi, F., Nakano, K., Nabeta, H., Hong, G.H., Kuwata, S., et Ito, K.(1996). Polymorphisms of the TAP1 and TAP2 transporter genes in Japanese SLE. *Ann Rheum Dis* **55**, 924-926.

Tang, J., Allen, S., Karita, E., Musonda, R., et Kaslow, R.A.(1998). New TAP2 polymorphisms in Africans. *Tissue Antigens* **51**, 556-562.

Tang, J., Freedman, D.O., Allen, S., Karita, E., Musonda, R., Braga, C., Jamieson, B.D., Louie, L., et Kaslow, R.A.(2001). Genotyping TAP2 variants in North American Caucasians, Brazilians, and Africans. *Genes Immun* **2**, 32-40.

Tang, J., Freedman, D.O., Allen, S., Karita, E., Musonda, R., Braga, C., Margolick, J., et Kaslow, R.A.(2001). TAPI polymorphisms in several human ethnic groups: characteristics, evolution, and genotyping strategies. *Hum Immunol* **62**, 256-268.

Taylor, G.R. (1997). Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA., CRC Press inc.,

Teisserenc, H., Schmitt, W., Blake, N., Dunbar, R., Gadola, S., Gross, W.L., Exley, A., et Cerundolo, V.(1997). A case of primary immunodeficiency due to a defect of the major histocompatibility gene complex class I processing and presentation pathway. *Immunol Lett* **57**, 183-187.

Trowsdale, J., Hanson, I., Mockridge, I., Beck, S., Townsend, A., et Kelly, A.(1990). Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* **348**, 741-744.

Tuokko, J., Nejentsev, S., Luukkainen, R., Toivanen, A., et Ilonen, J.(2001). HLA haplotype analysis in Finnish patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **44**, 315-322.

Uebel, S., Meyer, T.H., Kraas, W., Kienle, S., Jung, G., Wiesmuller, K.H., et Tampe, R.(1995). Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries. *J Biol Chem* **270**, 18512-18516.

Uebel, S. et Tampe, R.(1999). Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr Opin Immunol* **11**, 203-208.

UNAIDS. (2000) Report on the global HIV/AIDS epidemic, June 2000. Available from URL : [http://www.unaids.org/epidemic\\_update/report/index.html](http://www.unaids.org/epidemic_update/report/index.html)

van Endert, P.M.(1999). Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr Opin Immunol* **11**, 82-88.

van Endert, P.M., Tampe, R., Meyer, T.H., Tisch, R., Bach, J.F., et McDevitt, H.O.(1994). A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* **1**, 491-500.

- Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P.G., Ploegh, H.L., et Tonegawa, S.(1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* **71**, 1205-1214.
- Vassilakos, A., Cohen-Doyle, M.F., Peterson, P.A., Jackson, M.R., et Williams, D.B.(1996). The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J* **15**, 1495-1506.
- Vejbaesya, S., Luangtrakool, P., Luangtrakool, K., Sermduangprateep, C., et Parivisutt, L.(2000). Analysis of TAP and HLA-DM polymorphism in thai rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* **61**, 309-313.
- Velarde, G., Ford, R.C., Rosenberg, M.F., et Powis, S.J.(2001). Three-dimensional structure of transporter associated with antigen processing (TAP) obtained by single Particle image analysis. *J Biol Chem* **276**, 46054-46063.
- Vinasco, J., Fraile, A., Nieto, A., Beraun, Y., Pareja, E., Mataran, L., et Martin, J.(1998). Analysis of LMP and TAP polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **57**, 33-37.
- Vos, J.C., Reits, E.A., Wojcik-Jacobs, E., et Neefjes, J.(2000). Head-head/tail-tail relative orientation of the pore-forming domains of the heterodimeric ABC transporter TAP. *Curr Biol* **10**, 1-7.
- Vos, J.C., Spee, P., Momburg, F., et Neefjes, J.(1999). Membrane topology and dimerization of the two subunits of the transporter associated with antigen processing reveal a three-domain structure. *J Immunol* **163**, 6679-6685.
- Williams, D.B. et Watts, T.H.(1995). Molecular chaperones in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **7**, 77-84.
- Yan, G., Shi, L., et Faustman, D.(1999). Novel splicing of the human MHC-encoded peptide transporter confers unique properties. *J Immunol* **162**, 852-859.
- Yan, G., Shi, L., Fu, Y., Wang, X., Schoenfeld, D., Ma, L., Penfornis, A., Gebel, H., et Faustman, D.L.(1997). Screening of the TAP1 gene by denaturing gradient gel

electrophoresis in insulin-dependent diabetes mellitus: detection and comparison of new polymorphisms between patients and controls. *Tissue Antigens* **50**, 576-585.

York, I.A., Chang, S.C., Saric, T., Keys, J.A., Favreau, J.M., Goldberg, A.L., Rock, K.L.(2002). The ER aminopeptidase ERAP 1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nature immunology* **3**, 1177-1184.

Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampé, R., Lazis, S., et Hammerschmidt, W.(1997). Down-regulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* **90**, 2390-2397.

Zhu, K., Wang, J., Zhu, J., Jiang, J., Shou, J., et Chen, X.(1999). p53 induces TAP1 and enhances the transport of MHC class I peptides. *Oncogene* **18**, 7740-7747.

Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., et Orth, P.(2001). Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* **409**, 739-743.

## Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce mémoire et qui m'ont aidé tout au long de ma maîtrise. Un merci particulier à mon directeur de recherche, D<sup>r</sup> Michel Roger pour son appui et ses nombreux conseils. Merci au personnel du laboratoire d'immunogénétique Julie Lacaille pour son aide et son amitié, Claudine Matte, Marie-Claude Faucher et Annie Jeanneau. Merci à mes amis Joséphine Aho, Jonas Lefèvre, Igal Ifergan, Simon Gagnon et Isabelle Garber pour votre humour, vos encouragements, votre présence dans ma vie et une certaine promesse pas toujours facile à suivre mais tout de même amusante. Vous m'avez beaucoup aidé durant ma maîtrise et ce à plusieurs niveaux.

Merci du plus profond de mon cœur à ma famille, papa, maman et Guillaume. Merci pour votre support et vos encouragements, sans vous je ne serais pas celle que je suis devenue aujourd'hui et je ne serais pas rendu là. Je vous aime énormément. Merci pour tout.

## *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire tout d'abord à ma famille. À mes parents qui appuient chacune de mes décisions et qui m'ont toujours appuyée et encouragée. Sans votre soutien moral et financier tout cela n'aurait pas été possible. Merci du plus profond de mon cœur.*

*À mon petit frère que j'aime énormément et qui me fait toujours rire malgré ses niaiseries pas toujours drôles.*

*À mes amis qui m'ont fait avoir une vie sociale durant ma maîtrise.*



## Annexe

**4ième Congrès annuel  
des étudiants, stagiaires, et résidents  
du Centre de recherche du CHUM**

**Jeudi le 20 décembre 2001**

**Hôpital Notre-Dame du CHUM**

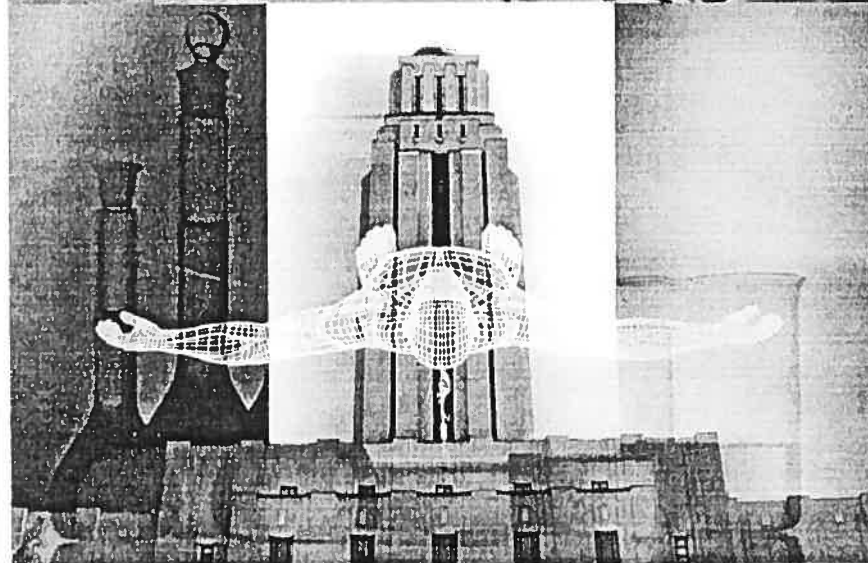
---

## Le polymorphisme des gènes TAP1 et TAP 2 chez les africains

Julie Lajoie<sup>1,2</sup> et Michel Roger<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire immunogénétique du centre de recherche du CHUM, <sup>2</sup>Département de microbiologie et immunologie de l'université de Montréal.

**Objectifs et hypothèse:** TAP transporte les peptides du cytosol au réticulum endoplasmique où il les présente au CMH I. Les différences alléliques de TAP peuvent entraîner des différences dans la présentation des peptides au CMH I et prédisposer à développer certaines maladies. TAP a été associé avec plusieurs maladies auto-immunes, cancer et maladies infectieuses dont le SIDA. Le but de notre étude est de définir le polymorphisme des gènes TAP1 et TAP2 chez des Africains. **Méthodes :** Nous avons exploré la séquence ADN de tous les exons de TAP1 (11 exons) et de TAP2 (11 exons) chez des Africains (Shona) non apparentés, par SSCP et par séquençage direct de l'ADN. **Résultats :** Nous avons effectué des SSCP et fait le séquençage. Nous pouvons confirmer 7 mutations pour TAP 1 et 11 pour TAP 2 déjà décrites. Nous avons trouvé 4 nouvelles mutations pour TAP 1 et 6 pour TAP 2. Trois d'entre elles pour TAP 1 sont situées dans l'exon 1 soit : 7Pro pour une Ser, 17Gly pour une Arg et 141Val(GTC) pour (GGT). La quatrième se situe dans l'exon 4 en position 487 Arg(CGC) pour une Arg(CGT). Pour TAP 2 les nouvelles mutations se retrouvent dans l'exon 1 (15Val pour une Ala, 53Leu pour une Val), dans l'exon 3 (220 Arg(CGA) pour (AGA), dans l'exon 4 (257Thr pour un Ile) et dans l'exon 10 (313Arg pour une His et 609Ala pour une Val). **Conclusion :** Notre étude exhaustive du polymorphismes de TAP chez des Africains nous a permis d'identifier de nouveaux variants génétique qui pourraient avoir un rôle important dans la fonction de TAP. Nous procédons maintenant à définir le lien entre ces TAP et la susceptibilité à l'infection au VIH dans une étude cas-contrôle de 400 individus Africains.



Résumés des  
communications

Congrès des stagiaires  
de recherche en santé  
de la Faculté de médecine,  
du CHUM et des centres  
hospitaliers et instituts  
affiliés à l'Université  
de Montréal

Le 22 janvier 2003  
Palais des Congrès  
de Montréal

## LE POLYMORPHISME DES GÈNES TAP1 ET TAP2 EN RELATION AVEC LA SUSCEPTIBILITÉ AU VIH CHEZ LES AFRICAINS

<sup>1,2</sup> Julie Lajoie, <sup>1,2</sup> Michel roger

<sup>1</sup>Département de microbiologie et d'immunologie de l'Université de Montréal, <sup>2</sup> Centre de recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame

Introduction : Le transporteur des antigènes apprêtés (TAP) composé des sous-unités TAP1 et TAP2 transporte les antigènes du cytosol au CMH-I. Certaines mutations dans les gènes TAP modulent la progression vers le Sida chez les personnes VIH+. Comme l'infection par le VIH est très présente en Afrique, nous avons testé l'hypothèse que des variations génétiques dans TAP1 et TAP2 pourraient influencer la susceptibilité à l'infection au VIH chez les Zimbabwéens. Méthodes : Dans un premier temps, nous avons analysé la séquence complète de TAP1 et de Tap2 par SSCP et séquençage direct. Ensuite, nous avons typé certaines mutations par A-RFLP et ARMS dans la population zimbabwéenne de 100 individus VIH+ et de 100 individus VIH-. Résultats : Nous avons identifié dans les régions codantes 11 mutations pour TAP1 et 17 pour TAP2. Par la suite, nous avons déterminé la distribution des mutations significatives pour les deux groupes. Les mutations, que nous avons typé, entraînent une substitution d'acide aminé et sont localisées dans le domaine de liaison peptidique ou de liaison à l'ATP. Donc, pour TAP1 nous avons typé les mutations I333V, A370V, G419C, D637G et R648Q; et pour TAP2, T257I, R313H, A374T, V379I, A565T, A609V et T665A. Discussion/Conclusion : Nous avons identifié de nouvelles mutations qui peuvent avoir un impact sur la fonction de l'hétérodimère. De plus, des différences de distributions alléliques ont été aperçues entre notre population et les Caucasiens. Nous n'avons observé aucune différence en ce qui concerne la distribution allélique de nos deux groupes, ce qui nous portent à croire que les mutations dans TAP n'affectent pas la susceptibilité à l'infection au VIH chez les Africains mais cela peut-être différent dans les autres populations.

Projet subventionné par :

